



**Carla Andrade  
Rodrigues**

**Deteção e Caracterização Molecular do  
Poliomavírus em Transplantados**



**Carla Andrade  
Rodrigues**

**Deteção e Caracterização Molecular do  
Poliomavírus em Transplantados**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Rui Medeiros Silva, Professor Auxiliar Convidado do Instituto Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e Investigador do Instituto Português de Oncologia do Porto.

## **o júri**

presidente

**Prof. Dr. Fernando José Mendes Gonçalves**  
professor associado da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
professora auxiliar da Universidade de Aveiro

**Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho**  
professor auxiliar convidado da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho

**Prof. Dr. Rui Manuel de Medeiros Melo Silva**  
professor auxiliar convidado do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

## **agradecimentos**

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, meu orientador neste trabalho, o meu muito obrigada pelo apoio, pelo incentivo e por ter acreditado em mim, sobretudo naqueles momentos mais críticos!

À Professora Doutora Sónia Mendo, coordenadora do mestrado, pela ajuda prestada ao longo destes dois anos.

À Dra. Inês Baldaque e à Dra. Alzira Carvalhais, pelo fornecimento e recolha das amostras que possibilitaram a realização deste estudo. Queria também agradecer à enfermeira Elisabete e ao enfermeiro Paulo a ajuda prestada no serviço de dadores. Ao Dr. Campilho, a cedência dos dados clínicos dos doentes.

À Professora Doutora Kristina Doerries, à Andrea, ao Silviu, ao Bernard e à Barbara o meu OBRIGADA! Sem o vosso apoio, compreensão e companhia não teria sido possível passar aquele tempo todo sozinha...

Aos colegas do IPO que, como eu, acreditam na investigação, apesar de todas as dificuldades com que nos deparamos diariamente, quero apenas dizer que não desistam porque a vida é feita de pequenas vitórias! Queria agradecer em particular à Isabel, pela sua boa disposição, pela sua vontade de conversar, pela sua “porca chamada rosa” e... pelas nossas tertúlias tardias; à Alexandra, pelo seu “enorme coração”, por me ter surpreendido num momento especial (aquele que tu sabes...) e claro... pelas suas reportagens fotográficas; ao Hugo, que também se tem revelado um bom amigo, às vezes teimoso, mas compreensivo, à Ana Luísa (minha futura companheira de secretária...), pelas suas brincadeiras e pelas nossas conversas e desabaços. Queria agradecer especialmente à Daniela, que, ao contrário do que dizem, não tem “mau feitio”, pelo enorme apoio que me tem dado desde o primeiro dia quer no trabalho quer fora deste!

Claro que não posso deixar de referir a minha família que SEMPRE apoiou todas as minhas decisões, apesar de algumas delas terem sido muito difíceis de tomar! À minha mãe, pelas nossas longas conversas e pela paciência infinita para com os meus pessimismos. A meu pai, por acreditar sempre na sua “aventureira” e por querer dar-me mais e mais. Ao meu irmão, por conseguir pôr-me fora de mim! Aos meus avós, pelo carinho com que acompanham e apoiam o meu percurso.

Ao Gonçalo, pela paciência, por aturar as minhas “rabugices”, por ter acreditado e por ter estado sempre presente, mesmo quando estávamos em lados opostos do mundo...

## palavras-chave

poliomavírus, indivíduos saudáveis, transplantação de células progenitoras hematopoiéticas

## resumo

Os poliomavírus humanos – BKV e JCV – são membros da família *Polyomaviridae*. As infecções primárias por estes vírus ocorrem geralmente durante a infância e são em regra assintomáticas. Após a infecção primária, os vírus persistem como infecções latentes em vários órgãos, principalmente nos rins. Em condições de imunossupressão, tais como SIDA e transplantação de órgãos, os poliomavírus podem ser reactivados e causar doença. A reactivação do BKV é essencialmente associada a doenças do tracto urinário, como a cistite hemorrágica e outras nefrites. O JCV pode ser reactivado e induzir a leucoencefalopatia multifocal progressiva.

Os objectivos deste trabalho foram a detecção dos poliomavírus, em indivíduos dadores de sangue e em doentes submetidos a transplantação de células de progenitoras hematopoiéticas no IPO – Porto, e a elaboração de um protocolo molecular que permitisse a medição do RNAm precoce e tardio.

A metodologia utilizada foi a técnica de *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* e a técnica de *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. Foram analisadas 498 amostras de DNA de indivíduos saudáveis e detectou-se o JCV em 23.9% das amostras analisadas; o BKV foi detectado em 1.8% das amostras, e 74.3% dos indivíduos foram negativos para a presença dos poliomavírus. Foi nos indivíduos do sexo masculino que se detectou o maior número de positivos – 29.5% ( $p=0.026$ ). Quando comparamos a frequência dos poliomavírus com a idade dos indivíduos, verificamos que há um aumento significativo da frequência nos indivíduos com mais de 56 anos ( $p=0.006$ ). No grupo dos 34 pacientes detectou-se o BKV em 58.8% dos pacientes; o BKV e o JCV foram detectados em 5.9% dos pacientes, e 35.3% foram negativos para a presença dos poliomavírus. Comparou-se a frequência dos poliomavírus entre os dois grupos estudados e verificou-se que o grupo de doentes tinha um risco acrescido de 5.30 para excretar poliomavírus na urina (OR=5.30; 95% CI 2.4-11.74;  $p<0.001$ ).

Das células Vero infectadas com o BKV extraiu-se o RNA total e por transcrição reversa obteve-se o DNA complementar. Amplificou-se o RNA mensageiro correspondente ao antígeno T grande e à proteína VP1.

Os nossos resultados demonstram que a frequência dos poliomavírus na nossa população é diferente da frequência em algumas populações europeias e semelhante a algumas populações asiáticas. O poliomavírus mais frequente no grupo de doentes é o BKV, o que está de acordo com outros estudos. Através da medição do RNAm que origina a proteína VP1, é possível distinguir-se entre uma infecção latente e uma infecção activa.

Futuros estudos são necessários de forma a completar-se o perfil do poliomavírus em indivíduos saudáveis e em doentes, contribuindo para a descoberta de novas terapias e de novos métodos de diagnóstico.

## keywords

polyomavirus, healthy individuals, bone marrow transplant

## abstract

The human polyomaviruses – BKV and JCV – are member of the *Polyomaviridae* family. Primary infections with BKV and JCV occur during childhood and are usually asymptomatic. Following primary infection, the viruses persist as latent infection in many organs, particularly in the kidneys. Under conditions of immunosuppression such as AIDS and organ transplantation both viruses may be reactivated and cause disease. Reactivation of BKV is mainly related to urinary tract diseases such as haemorrhagic cystitis and others nephritis. JCV can be reactivated and induces the disease progressive multifocal leukoencephalopathy.

The goals of our study were the detection of polyomaviruses in bone marrow transplant recipients and in blood donors from IPO-Porto; and conceive a molecular protocol to the detection of early and late mRNA.

The methodologies used were Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. We analysed 498 DNA samples from healthy individuals and we detected JCV in 23.9% of the analysed samples, BKV in 1.8% of the samples and 74.3% of the individuals were negative for polyomaviruses. The males had more positives samples – 29.5% – than the females ( $p=0.026$ ). When we compared the frequency of polyomaviruses with the age of the individuals we found that it was significantly increased in the individuals with more than 56 years old ( $p=0.006$ ). In the group of the 34 patients we detected BKV in 58.8% of the patients, BKV and JCV were found in 5.9% and 35.3% were negative for both viruses. We compared the frequency of polyomaviruses between the two groups and we found that the patients have a 5.30 increase in the risk of having polyomaviruses in the urine (OR=5.30; 95% CI 2.4-11.74;  $p<0.001$ ).

From the Vero cells infected by BKV we could extract total RNA and reverse transcribed to complementary DNA. We amplified the mRNA encoding the large T antigen and the VP1 protein.

Ours results reveal that the frequency of polyomaviruses in our population is different from other European populations and similar to Asian populations. The more frequent polyomavirus in our patients is BKV, which is comparable to other reports. By measuring the mRNA encoding the VP1 protein it is possible to differentiate between a latent or active infection.

Further studies are needed to complete the polyomaviruses profile in healthy individuals and in patients to contribute to the discovery of novel therapies and new diagnostic methods.

---

# ÍNDICE

<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1. Poliomavírus</b>	<b>1</b>
1.1. Biologia Molecular dos Poliomavírus	2
1.1.1. Genoma Viral	3
1.1.2. Região Controlo não codificante	4
1.1.3. Região precoce e proteínas	5
Antigénio T grande	6
Antigénio t pequeno	7
1.1.4. Região tardia e proteínas	8
Agnoproteína	8
Proteína VP1	9
Proteínas VP2 e VP3	9
1.2. Propriedades, características e ciclo viral	10
1.2.1. Entrada nas células hospedeiras	10
1.2.2. Replicação do genoma viral	13
<b>2. Infecção primária e reactivação</b>	<b>17</b>
<b>3. Epidemiologia e Serologia</b>	<b>21</b>
<b>4. Formas de transmissão do vírus e propagação no hospedeiro</b>	<b>23</b>
<b>Objectivos</b>	<b>25</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>27</b>
População	27
Indivíduos saudáveis	27
Pacientes sujeitos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas	28
Extracção do DNA viral	28
Amplificação do DNA viral por <i>Polymerase Chain Reaction</i>	29
Amplificação do DNA do poliomavírus por <i>Polymerase Chain Reaction</i>	29
Visualização do fragmento amplificado	30
Identificação do BKV e JCV por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	31
Visualização dos fragmentos obtidos por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>	31
Tratamento estatístico	31
Cultura celular e Infecção por BK vírus	32

---

Manutenção das células Vero em cultura _____	32
Infecção por BK vírus _____	33
Extracção do RNA total e tratamento da amostra com a enzima <i>DNase</i> _____	34
Contagem das células _____	34
Extracção do RNA total _____	35
Tratamento das amostras com a enzima <i>DNase</i> _____	35
Síntese de DNA complementar a partir do RNA mensageiro _____	36
Amplificação do DNAc por <i>Polymerase Chain Reaction</i> _____	37
<b><i>Resultados</i></b> _____	<b>41</b>
Amplificação do DNA do poliomavírus e identificação do BKV e do JCV _____	41
Análise da frequência do poliomavírus na população de indivíduos saudáveis _____	43
Comparação com outras populações de indivíduos saudáveis _____	46
Análise da frequência do poliomavírus nos doentes _____	47
Comparação entre o grupo de indivíduos saudáveis e o grupo de doentes _____	52
Infecção, contagem das células e extracção do RNA total _____	53
Síntese de DNAc a partir do RNAm _____	55
Amplificação do DNAc por PCR _____	56
Antigénio T grande _____	56
Proteína VP1 _____	58
<b><i>Discussão</i></b> _____	<b>61</b>
Grupo dos indivíduos saudáveis _____	62
Grupo dos doentes _____	64
Infecção, contagem e extracção do RNA total _____	66
Amplificação do DNAc por PCR _____	67
<b><i>Conclusões e Perspectivas Futuras</i></b> _____	<b>69</b>
<b><i>Bibliografia</i></b> _____	<b>71</b>
<b><i>Anexos</i></b> _____	<b>87</b>



---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo dos 72 cápsomeros pentaméricos da cápside dos poliomavírus (Frisque, 1999).	3
<b>Figura 2.</b> Esquema representativo da organização da região reguladora do JCV (Frisque, 1999).	4
<b>Figura 3.</b> Esquema representativo da organização da região reguladora do BKV (Frisque, 1999).	5
<b>Figura 4.</b> Locais de ligação entre o antígeno T grande do JCV e proteínas (NLS – <i>nuclear localization signal</i> ; Zn – região de ligação do metal; HR – intervalo de domínio do hospedeiro; Pol – região de ligação do DNA polimerase-primase; J – sequências homólogas ao domínio J das proteínas do DnaJ; P – locais de fosforilação da serina e da treonina) (Frisque, 1999).	7
<b>Figura 5.</b> Tipos de infecção. Nas células permissivas, o ciclo de vida do vírus está completo e há a produção de virões. Nas células não permissivas, a replicação do vírus é bloqueada e pode ocorrer um infecção abortiva ou a transformação das células do hospedeiro (adaptado de Imperiale, 2001).	11
<b>Figura 6.</b> Diferentes vias de endocitose utilizadas pelos vários poliomavírus. O JCV utiliza a via de endocitose dependente de clatrina, o SV40 e o BKV utilizam a via da endocitose dependente de caveola, e o PyV utiliza a via de endocitose dependente de vacúolos sem revestimento. O genoma destes vírus tem de atingir o núcleo para continuar o seu ciclo de vida (RE – retículo endoplasmático) (adaptado de Atwood, 2001).	13
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática dos tipos de RNA mensageiro transcritos do genoma do JCV (Mad-1) (M1 – codifica a agnoproteína, a VP2 e a VP3; M2 – codifica a agnoproteína e a VP1; M3 – codifica a agnoproteína e uma potencial ORF; M4 – codifica a agnoproteína e uma nova potencial ORF) (adaptado de Shishido-Hara <i>et al.</i> , 2000).	15
<b>Figura 8.</b> Representação esquemática do ciclo de vida do poliomavírus numa célula permissiva. O ciclo de vida inicia-se com a ligação do vírus ao receptor celular (1). Depois da interacção inicial, o vírus entra no citoplasma da célula por endocitose (2). O vírus é transportado para o núcleo (3) onde a descapsidação ocorre (4) para expor o genoma para a expressão dos genes precoces (5). A síntese do DNA viral (6) precede a produção das proteínas tardias (7), permitindo a formação de novos viriões, que são libertados no exterior (8), completando a infecção (adaptado de Eash <i>et al.</i> , 2006).	17

---

<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da infecção e replicação do BKV e do JCV. Estes vírus infectam células dos rins, do cérebro, do fígado, da retina, dos pulmões, do sangue, dos gânglios linfáticos, do coração, do músculo e células endoteliais vasculares. As partículas virais depois de entrarem no núcleo da célula hospedeira replicam-se e formam novas partículas virais (RNAm-RNA mensageiro) (adaptado de Fishman, 2002).	19
<b>Figura 10.</b> Relação entre a idade e a prevalência dos anticorpos específicos para o BKV e para o JCV (adaptado de Frisque, 1999).	22
<b>Figura 11.</b> Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos <i>primers</i> PEP-1 e PEP-2 (M – marcador molecular de 50pb; 1-13 – amostras positivas para os poliomavírus).	41
<b>Figura 12.</b> Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à digestão pela enzima <i>Bam</i> HI (M – marcador molecular de 100pb; 4 – controlo positivo de DNA do JCV; 1-3 e 5 – amostras positivas para o BKV; 6 – amostra positiva para o JCV).	42
<b>Figura 13.</b> Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à digestão pela enzima <i>Bam</i> HI (M – marcador molecular de 100pb; 1-2 e 5-6 – amostras positivas para o BKV/JCV; 3-4 e 7-13 – amostras positivas para o BKV).	42
<b>Figura 14.</b> Percentagem de indivíduos saudáveis, do sexo feminino e do sexo masculino, positivos ou negativos para a presença dos poliomavírus.	43
<b>Figura 15.</b> Distribuição dos casos positivos para os poliomavírus (JCV e BKV) pelo sexo, no grupo dos indivíduos saudáveis.	44
<b>Figura 16.</b> Distribuição dos casos positivos para os poliomavírus (JCV e BKV), de acordo com a faixa etária, no grupo dos indivíduos saudáveis.	45
<b>Figura 17.</b> Percentagem de indivíduos doentes, do sexo feminino e do sexo masculino, positivos ou negativos para a presença dos poliomavírus.	48
<b>Figura 18.</b> Distribuição do BKV, do BKV/JCV e a ausência dos poliomavírus, em cada paciente, ao longo dos meses.	51
<b>Figura 19.</b> Distribuição da presença do BKV, do BKV/JCV e da ausência dos poliomavírus, em 5 pacientes ao longo dos meses.	52
<b>Figura 20.</b> Evolução ao longo dos dias da concentração de RNA por milhão de células, para as amostras da primeira e segunda experiências, sob a influência da infecção por BKV.	55
<b>Figura 21.</b> Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos <i>primers</i> do gene da $\beta$ -actina (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 7 – controlos negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-6 – amostras das células infectadas; 8 – controlo positivo).	56

---

---

**Figura 22.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 307 e 308 (M – marcador molecular de 100pb; 1, 6 e 12 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-5 e 7-11 – amostras das células infectadas; 13 – controlo positivo). \_\_\_\_\_ 56

**Figura 23.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 309 e 310 (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 13 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-12 – amostras das células infectadas; 14 – controlo positivo). \_\_\_\_\_ 57

**Figura 24.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 310 e 311 (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 13 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-12 – amostras das células infectadas; 14 – controlo positivo). \_\_\_\_\_ 57

**Figura 25.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 313 e 314 (M – marcador molecular 31 de 100pb; 1 e 6 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-5 e 7-8 – amostras das células infectadas; 9 – controlo positivo). \_\_\_\_\_ 58

**Figura 26.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 249 e 314 (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 6 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-5 e 7-8 – amostras das células infectadas; 9 – controlo positivo). \_\_\_\_\_ 58



---

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reacções de PCR e as regiões amplificadas no DNA e no DNAc. _____	39
<b>Tabela 2.</b> Frequência do JC vírus em várias populações de indivíduos saudáveis. _____	46
<b>Tabela 3.</b> Caracterização do grupo de doentes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas (número e frequência dos casos para o diagnóstico, para o tipo de transplante, para o parentesco e para a detecção dos vírus, relativamente ao primeiro transplante). _____	49
<b>Tabela 4.</b> Número de células nos 5ml, <i>ratio</i> , concentração do RNA total, RNA total na amostra e RNA total por milhão de células, para as amostras da infecção da primeira experiência. _____	53
<b>Tabela 5.</b> Número de células nos 5ml, <i>ratio</i> , concentração do RNA total, RNA total na amostra e RNA total por milhão de células, para as amostras da infecção da segunda experiência. _____	54
<b>Tabela 6.</b> Resultados das reacções de amplificação do controlo e das amostras, em ambas as infecções (– não amplificou; ± amplificou fracamente; + amplificou). _____	59



---

## LISTA DE SÍMBOLOS

**JCV** – JC vírus

**BKV** – BK vírus

**SV40** – *simian virus 40*

**PyV** – *mouse polyoma vírus*

**pb** – pares de base

**LMP** – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

**HIV** – *human immunodeficiency virus*

**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*

**RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*

**RT-PCR** – *Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction*

**IgM** – Imunoglobulina M

**IgG** – Imunoglobulina G

**T-Ag** – Antígeno T grande

**t-Ag** – Antígeno t pequeno

**SIDA** – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

**PBS** – *Phosphate buffered saline*

**ATV** – *Antibiotics Trypsin Versene*

**MEM** – *Minimum Essential Medium*

**FCS** – *Fetal Calf Serum*





---

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação no estudo de vírus que afectam os doentes oncológicos submetidos a transplantação. As infecções víricas originam lesões nos tecidos, contribuem para uma imunossupressão sistémica, podem causar falência de enxerto e nalguns casos estão associadas a neoplasias secundárias. Estas infecções são causas significativas de morbilidade e mortalidade após a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas e podem ocorrer como resultado da exposição a novos vírus ou à reactivação de vírus latentes no paciente. Alguns destes vírus são: o Citomegalovírus, o vírus Epstein-Barr, o Herpesvírus-6, o Adenovírus e os Poliomavírus – JCV e BKV – que afectam os humanos, sendo o BKV o mais associado a complicações pós-transplantação. O estudo dos poliomavírus é por isso emergente, sendo esses os vírus objecto desta dissertação.

### 1. POLIOMAVÍRUS

Os poliomavírus pertencem ao género *Polyomavirus* (Grego: *poly*, muitos; *oma*, tumor), família *Polyomaviridae*, da qual já foram isolados doze tipos de várias espécies (Volter *et al.*, 1997), incluindo de humanos, macacos, coelhos, roedores e aves. Os dois primeiros vírus desta família a serem identificados foram o *mouse polyoma virus* (PyV) e o *simian virus 40* (SV40). O estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvendo estes vírus permitiu a compreensão de vários processos eucarióticos: transcrição, replicação do DNA, tradução, transdução do sinal, crescimento celular, regulação de genes e transformação oncogénica (acção de oncogenes e de genes supressores tumorais).

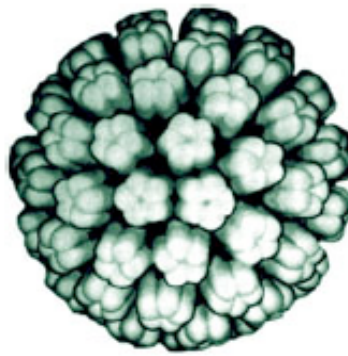
Em 1971, foram descritos pela primeira vez dois poliomavírus que afectam somente os humanos, o JC vírus (JCV) e o BK vírus (BKV), cujos nomes provêm das

iniciais dos doentes donde foram isolados pela primeira vez. Padgett e colaboradores (1971) isolaram o JCV de tecido cerebral de um paciente com Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP) e com Linfoma de Hodgkin. No mesmo ano, Gardner e colaboradores (1971) isolaram o BKV da urina de um paciente submetido a transplante renal. Algumas das estirpes dos poliomavírus que afectam os humanos foram isoladas e sequenciadas, tais como: JCV (Mad-1), BKV (Dunlop), BKV (MM) e BKV (AS), contendo 5130, 5153, 4963 e 5098 pares de base (pb), respectivamente.

Os genomas do BKV, do JCV e do SV40 apresentam grande homologia na sequência nucleotídica: o BKV e o JCV partilham 75% de homologia da sequência, enquanto que o SV40 partilha 69% da sequência com cada um deles (Yang and Wu, 1979; Frisque *et al.*, 1984). O PyV está pouco relacionado com o BKV e com o JCV. Muito do conhecimento actual, embora incompleto, acerca da biologia do BKV foi obtido com base em estudos comparativos com o SV40 e com o JCV.

### **1.1. Biologia Molecular dos Poliomavírus**

Os vírus JC e BK são vírus de pequenas dimensões, com um diâmetro de 40-45 nm, peso molecular de  $3 \times 10^6$  daltons e não são revestidos por um invólucro. O genoma encontra-se rodeado por uma cápside composta por três proteínas estruturais – VP1, VP2 e VP3 – de simetria icosaédrica com 72 pentâmeros de VP1 e 30 a 60 moléculas de VP2 e VP3 (figura 1) (Gardner and Knowles, 1995). Cada pentâmero encontra-se ligado através dos segmentos do terminal carboxilo (C-terminal) de cada monómero de VP1, que interage com os pentâmeros adjacentes. Cerca de 12% do virião é constituído pelo DNA viral e por 88% de proteínas. O DNA dos poliomavírus é circular, superenrolado, de cadeia dupla, sendo a informação genética codificada em ambas as cadeias. O ciclo replicativo e a formação dos viriões tem lugar no núcleo da célula hospedeira.



**Figura 1.** Esquema representativo dos 72 cápsomeros pentaméricos da cápside dos poliomavírus (Frisque, 1999).

#### 1.1.1. Genoma Viral

O genoma dos poliomavírus divide-se em três regiões: uma região controlo não codificante, uma região precoce (*early*) e uma região tardia (*late*). A região precoce e a região tardia são separadas pela replicação do DNA e em cada uma das fases são transcritos os genes de cada cadeia. A região codificante do genoma viral é altamente conservadora, enquanto que a região reguladora é variável (Seif *et al.*, 1979b; Sugimoto *et al.*, 1990).

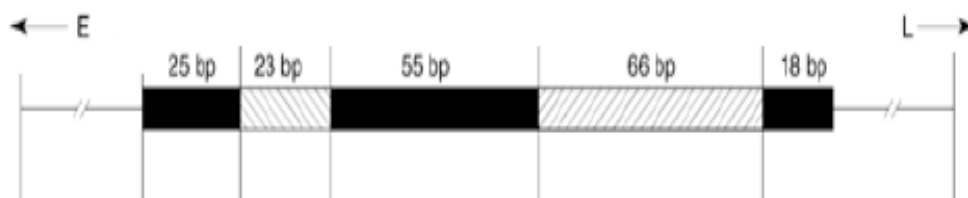
Geralmente, a partir do genoma dos poliomavírus são transcritas seis proteínas:

- os antígenos T grande (*large-T*) e t pequeno (*small-t*) produzidos antes da replicação viral
- uma agnoproteína e três proteínas estruturais – VP1, VP2 e VP3 – produzidas após a replicação viral (Gardner and Knowles, 1995).

### 1.1.2. Região Controlo não codificante

A região controlo não codificante (NCCR), também designada como Região Reguladora (RR), situa-se entre as duas regiões codificantes precoce e tardia, e contém a origem de transcrição para ambas. A região reguladora tanto do JCV como do BKV é composta pela origem de replicação, pelo promotor, pelo *enhancer*, por locais de ligação do antígeno T grande e por locais de ligação de factores de transcrição. Esta região é altamente variável nas diversas estirpes, talvez devido a rearranjos genéticos como resultado da adaptação a diferentes ambientes virais (Seif *et al.*, 1979b; Sugimoto *et al.*, 1990). Provavelmente essa diversidade confere uma vantagem selectiva para o vírus no hospedeiro, permitindo uma replicação e transcrição mais eficientes do genoma viral (Moens and Rekvig, 2001). Em estudos realizados *in vitro* foram encontradas algumas mutações, deleções e duplicações nas regiões de ligação de factores de transcrição. Estas variações alteram o funcionamento normal do promotor e do *enhancer*, influenciando desta forma a replicação (Johnsen *et al.*, 1995).

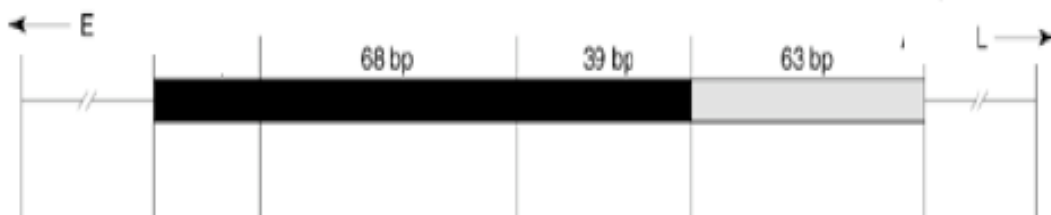
Relativamente ao JCV, foram encontradas duas formas de organização – o arquétipo e a forma rearranjada. O arquétipo é a forma mais frequente na população humana e é encontrado primariamente no rim e excretado na urina (Yogo *et al.*, 1990; Markowitz *et al.*, 1991). No arquétipo, a NCCR está organizada em seis domínios: A (25 pb), B (23 pb), C (55 pb), D (66 pb), E (18 pb) e F (figura 2) (Tominaga *et al.*, 1992).



**Figura 2.** Esquema representativo da organização da região reguladora do JCV (Frisque, 1999).

Os rearranjos que são encontrados no arquétipo do JCV podem influenciar a distribuição do vírus pelos tecidos e o seu potencial de replicação (Yogo *et al.*, 1990; Markowitz *et al.*, 1991; Ault and Stoner, 1993; Newman and Frisque, 1997).

No BKV, a NCCR é dividida em blocos: o promotor/*enhancer* bloco O (142 pb), P (68 pb), Q (39 pb), R (63 pb) e uma região tardia *leader* S (figura 3) (Ferguson and Subramani, 1994).



**Figura 3.** Esquema representativo da organização da região reguladora do BKV (Frisque, 1999).

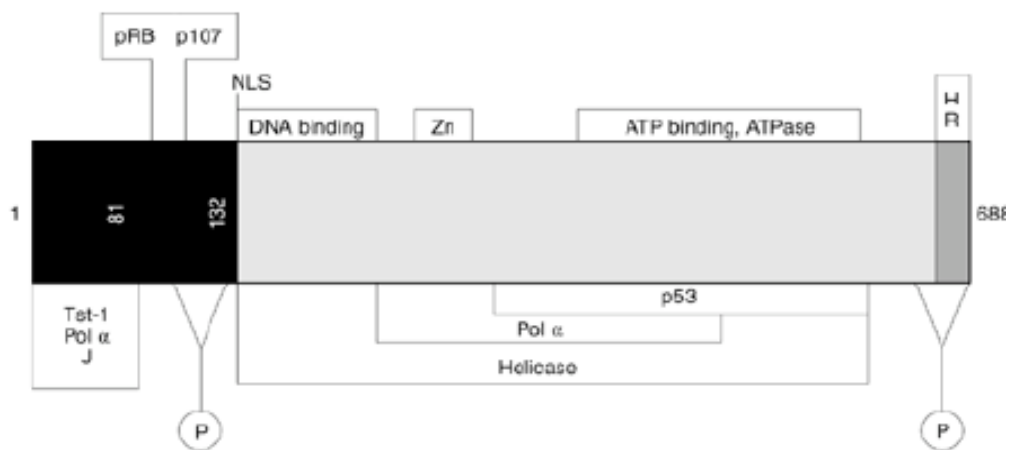
### 1.1.3. Região precoce e proteínas

A região precoce do JCV e do BKV codifica dois antígenos T que se localizam no núcleo da célula. Estas proteínas são denominadas de antígenos T devido ao facto de terem sido inicialmente detectadas através de reacções serológicas (antígenos) e estarem envolvidas no processo de transformação (T). O antígeno T grande (T-Ag) possui aproximadamente 688 aminoácidos (aa) e o antígeno t pequeno (t-Ag) possui aproximadamente 172 aminoácidos.

Os transcritos de RNA mensageiro (RNAm) destes dois antígenos têm origem num pré-RNA mensageiro comum que sofre *splicing* alternativo. Consequentemente, os dois antígenos partilham a sequência de aminoácidos do terminal amino (N-terminal).

### *Antigénio T grande*

O antigénio T grande é uma proteína multifuncional, embora sem função estrutural. Através das suas funções enzimáticas e da capacidade que tem em se ligar ao DNA e a várias proteínas celulares, regula a produção de RNA mensageiro precoce, a iniciação da replicação viral e a activação da transcrição dos genes tardios. É também responsável pelo estabelecimento e manutenção da transformação celular, levando em algumas situações à imortalização da célula (oncogénese) (Fishman, 2002). Para que o DNA viral replique, é necessário colocar a célula do hospedeiro na fase S do ciclo celular, permitindo que toda a maquinaria celular do hospedeiro se encontre disponível para ser utilizada na replicação. Para isso, a proteína T-Ag liga-se a várias proteínas celulares, tais como proteínas da família retinoblastoma (Rb) (DeCaprio *et al.*, 1988), à DNA polimerase (Dornreiter *et al.*, 1992) e à p53 (Staib *et al.*, 1996). Adicionalmente, a T-Ag apresenta actividade de helicase (Stahl *et al.*, 1986) e actividade ATPásica (Tjian and Robbins, 1979), que é crucial para a replicação do vírus (figura 4). No início da infecção, a T-Ag liga-se a três locais específicos na NCCR de forma a modular os transcritos da região precoce e da região tardia. A ligação ao sítio I regula a transcrição da região precoce (DiMaio and Nathans, 1982) e pode estar envolvida na destabilização da cadeia dupla de DNA ou suportar um passo mais tardio, quando actua como uma DNA helicase (Nesper *et al.*, 1997). A ligação ao sítio II regula a replicação viral, enquanto que a função da ligação de baixa afinidade ao sítio III continua desconhecida.



**Figura 4.** Locais de ligação entre o antígeno T grande do JCV e proteínas (NLS – *nuclear localization signal*; Zn – região de ligação do metal; HR – intervalo de domínio do hospedeiro; Pol – região de ligação do DNA polimerase-primase; J – sequências homólogas ao domínio J das proteínas do DnaJ; P – locais de fosforilação da serina e da treonina) (Frisque, 1999).

### *Antígeno t pequeno*

O papel que o antígeno t pequeno desempenha no ciclo de vida do BKV e do JCV ainda não é totalmente conhecido. Em estudos efectuados com o SV40, sabe-se que este antígeno tem a capacidade de se ligar à proteína fosfatase 2A (PP2A), inibindo a sua função. Isto resulta numa cascata de transdução do sinal que estimula o crescimento celular. O antígeno t pequeno pode ser importante na preparação do ambiente celular para uma replicação eficiente (Pallas *et al.*, 1990). Também foi observado em estudos *in vitro* com o SV40 que o ciclo de vida do poliomavírus ocorre na ausência do antígeno t pequeno. No entanto, *in vivo*, poderá ter alguma função lítica, sendo esta ainda desconhecida. Esta proteína, em conjunto com o antígeno T grande, poderá ter um papel na transformação das células (Seif *et al.*, 1979b).

#### 1.1.4. Região tardia e proteínas

A região tardia do JCV e do BKV codifica três proteínas virais que constituem a cápside, VP1 (~354 aa), VP2 (~344 aa), VP3 (~225 aa) e uma agnoproteína (~71 aa), que não faz parte da cápside. Os transcritos de RNAm da região tardia resultam de um pré-RNAm comum, que por *splicing* alternativo origina os diferentes transcritos que codificam as proteínas referidas.

##### *Agnoproteína*

No JCV e no BKV, a sequência da agnoproteína é homóloga nos primeiros dois-terços do terminal amino e localiza-se predominantemente no citoplasma (Rinaldo *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 2001). A agnoproteína parece facilitar o transporte de VP1 do citoplasma para o espaço perinuclear, durante a infecção lítica (Carswell and Alwine, 1986). Esta proteína desempenha funções reguladoras na transcrição viral, na tradução e na formação/maturação dos viriões. A sua presença resulta na supressão do crescimento celular, quando esta se liga directamente à proteína supressora de tumores – p53, e na supressão da proliferação celular devido à desregulação do ciclo celular (acumulação de células na fase G2/M) (Darbinyan *et al.*, 2002). A agnoproteína (proteína tardia) também interage com antígeno T grande (proteína precoce), influenciando a replicação e transcrição do DNA viral, e inibe a reparação do DNA celular quando este sofreu algum dano (Safak *et al.*, 2001; Darbinyan *et al.*, 2004). Em estudos efectuados com o SV40, a região codificante para a agnoproteína foi retirada e verificou-se que o vírus replicava o seu DNA, sugerindo que esta proteína não é necessária para este processo (Resnick and Shenk, 1986).



### ***Proteína VP1***

A VP1 é a maior proteína estrutural e tem a capacidade de se ligar a receptores celulares, sendo esta ligação crucial para a absorção na membrana celular. A VP1 apresenta os epítomos para a indução e reconhecimento dos anticorpos. Em estudos realizados com SV40, observou-se que em cada molécula de VP1 existem estruturas em *looping* que se projectam para o exterior, a partir da folha- $\beta$ . Estes *loops* externos proporcionam estruturas antigénicas, locais de ligação de receptores ou domínios responsáveis pela hemaglutinação. Devido a sequências específicas nesta região, tanto em JCV como em BKV podem surgir estruturas antigénicas diferentes (Shishido-Hara and Nagashima, 2001).

### ***Proteínas VP2 e VP3***

As proteínas VP2 e VP3 são duas proteínas internas que fazem parte da cápside. A sequência da região do terminal carboxilo de VP2 e VP3 corresponde a um domínio interactivo de VP1, a um domínio de ligação de DNA e a um *nuclear localization signal* (NLS). As proteínas VP2 e VP3 formam complexos com a proteína VP1 através do seu terminal carboxilo permitido, assim, a formação dos viriões. (Chang *et al.*, 1992; Barouch and Harrison, 1994; Shishido-Hara and Nagashima, 2001).

## 1.2. Propriedades, características e ciclo viral

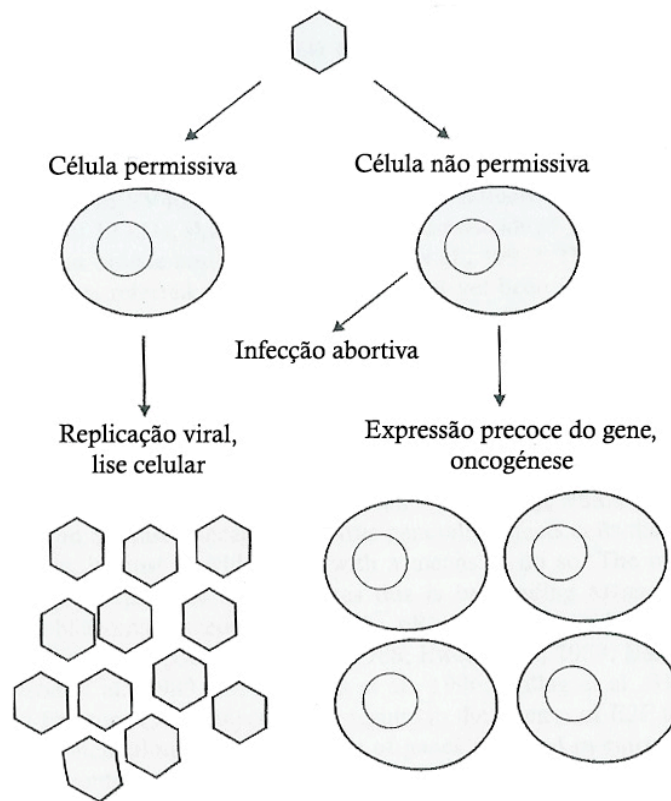
### 1.2.1. Entrada nas células hospedeiras

A interacção de um vírus, neste caso do poliomavírus, com uma célula é variável consoante o tipo de célula. A natureza da infecção é determinada pelas características do vírus e das células. É possível descrever-se três mecanismos de interacção do vírus com a célula (figura 5):

infecção produtiva – com um ciclo lítico, o qual tem lugar em células permissivas; existe uma replicação contínua do genoma viral seguida da formação de viriões e morte celular; ocorre quando o antígeno T grande interage com o DNA da célula hospedeira na fase S;

infecção não-produtiva ou abortiva – sem replicação do genoma viral devido à incapacidade do antígeno T grande reagir com o DNA da célula hospedeira não permissiva;

infecção persistente – o vírus persiste no interior da célula, por períodos mais ou menos longos, por vezes toda a vida do hospedeiro.



**Figura 5.** Tipos de infecção. Nas células permissivas, o ciclo de vida do vírus está completo e há a produção de virões. Nas células não permissivas, a replicação do vírus é bloqueada e pode ocorrer um infecção abortiva ou a transformação das células do hospedeiro (adaptado de Imperiale, 2001).

A expressão continuada do antígeno T grande em células não permissivas estimula a síntese de DNA celular e as células entram em proliferação. Uma percentagem destas células transforma-se de um modo estável, comportando-se como células malignas. Este fenómeno é acompanhado pela integração do DNA viral no genoma celular do hospedeiro e pela produção constante de antígenos T, os quais são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da transformação. Estes vírus não possuem mecanismos específicos de integração, sendo esta efectuada por um processo de recombinação heteróloga mediada pelas próprias células (Geraldes, 2002). Na infecção não-produtiva, uma parte do DNA do BKV pode integrar-se ao acaso no DNA do cromossoma do hospedeiro (Chenciner *et al.*, 1980).

O reconhecimento da célula hospedeira pelo vírus é determinante na eficiência da infecção viral. A presença ou ausência de receptores específicos ou pseudoreceptores contribuem para o tropismo, propagação e patogenicidade do vírus.

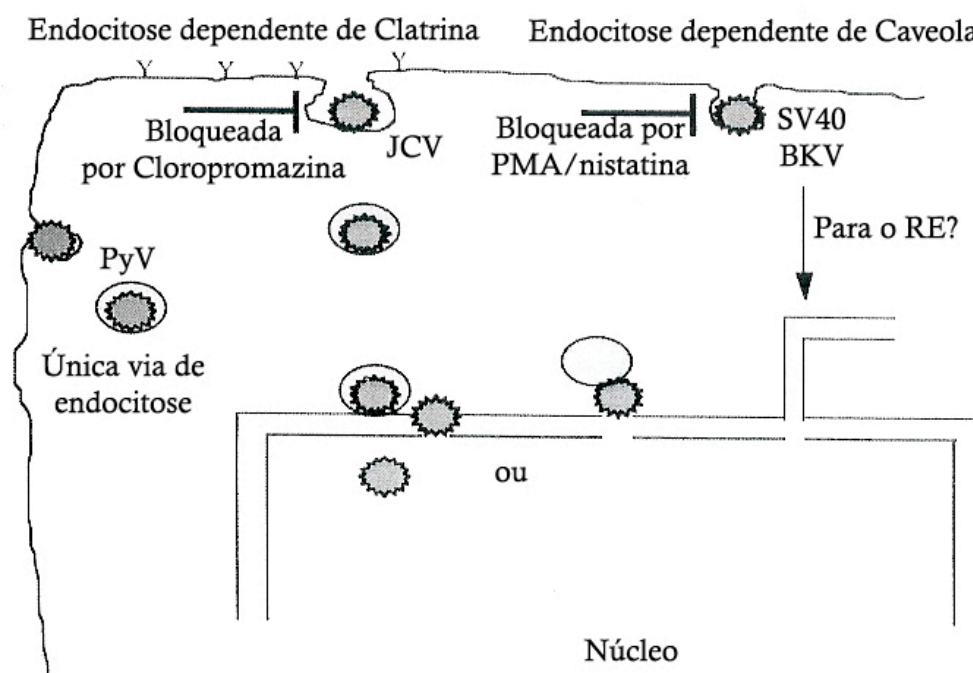
Os receptores celulares para o SV40 podem ser moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade de classe I (Breau *et al.*, 1992) e outras moléculas, tais como os gangliosídeos GM1, que regulam a ligação do vírus e permitem a sua entrada no retículo endoplasmático (RE) e expressão do antígeno T grande (Tsai *et al.*, 2003). A escolha de um determinado receptor pode influenciar a eficiência da infecção.

Para o BKV e para o JCV, a proteína VP1 e os receptores com resíduos de ácido siálico parecem desempenhar um papel importante. O receptor do JCV é uma glicoproteína resistente à tripsina, que contém no seu terminal ligações  $\alpha$ -2,6 nos resíduos do ácido siálico, para o caso de infecção em células humanas da glia; recentemente demonstraram que a serotonina 5HT<sub>2A</sub> também pode ser um receptor para o JCV (Seganti *et al.*, 1981; Elphick *et al.*, 2004).

Para o BKV, pensa-se que os receptores são gangliosídeos e foram isolados de eritrócitos humanos do tipo O e de células Vero. Sabe-se que o processo de aglutinação do BKV aos eritrócitos humanos é sensível à digestão por neuraminidase (cliva resíduos de ácido siálico). A remoção enzimática do ácido siálico dos receptores é o suficiente para inibir a infecção *in vitro* das células Vero por BKV e a subsequente adição de gangliosídeos às células restaura a infecção (Sinibaldi *et al.*, 1990). Low e colaboradores (2006) comprovaram que os gangliosídeos – GD1b e GT1b – se ligam *in vitro* ao BKV e que estes são os seus receptores celulares. A interacção entre o BKV e as membranas celulares é independente de proteínas, mas dependente dos resíduos de ácido siálico, que são geralmente encontrados nos gangliosídeos. As GD1b e GT1b conferem susceptibilidade à infecção e contêm ambos uma ligação  $\alpha$ -2,8 nos resíduos do ácido siálico. É possível que esta ligação específica seja necessária para uma interacção produtiva entre o vírus e o receptor. Este estudo também demonstrou que o BKV interage com as membranas do retículo endoplasmático e que o transporte do vírus através deste é crucial para a entrada do genoma viral no núcleo hospedeiro.

O mecanismo de entrada do SV40, do BKV e do JCV faz-se por endocitose dependente de proteínas de caveola (SV40 e BKV) e de clatrina (JCV) (figura 6). O

receptor utilizado condiciona a via de endocitose usada pelos diferentes poliomavírus para penetrar na membrana plasmática (Pho *et al.*, 2000).



**Figura 6.** Diferentes vias de endocitose utilizadas pelos vários poliomavírus. O JCV utiliza a via de endocitose dependente de clatrina, o SV40 e o BKV utilizam a via da endocitose dependente de caveola, e o PyV utiliza a via de endocitose dependente de vacúolos sem revestimento. O genoma destes vírus tem de atingir o núcleo para continuar o seu ciclo de vida (RE – retículo endoplasmático) (adaptado de Atwood, 2001).

### 1.2.2. Replicação do genoma viral

Após a entrada do vírus no núcleo da célula hospedeira, ocorre a descapsidação das partículas virais e inicia-se a transcrição bidireccional e a replicação do genoma. Os diferentes hospedeiros e a especificidade do tecido, bem como algumas variações nas sequências do *core origin* (Nesper *et al.*, 1997), influenciam a

replicação do DNA viral. Observaram-se algumas diferenças na replicação destes três poliomavírus e estas sugerem que o modelo de replicação viral do SV40 não é suficientemente preciso para descrever o processo de replicação para os poliomavírus humanos (Kim *et al.*, 2001).

Para que ocorra a replicação e transcrição do genoma dos poliomavírus, são necessários três componentes distintos:

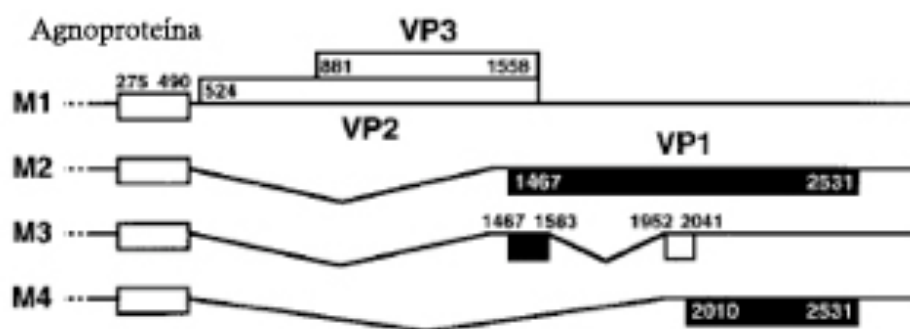
- uma proteína viral *trans-acting* - antígeno T grande;
- um elemento do DNA viral *cis-acting* – *core origin* que é necessário e suficiente para o início da replicação *in vivo* e *in vitro*;
- um conjunto de factores, nomeadamente proteínas que são expressas pela célula eucariota permissiva.

O DNA viral encontra-se associado a várias histonas celulares, de um modo muito semelhante aos nucleossomas da cromatina, constituindo um minicromossoma viral. O DNA do poliomavírus é formado por um conjunto de aproximadamente vinte e um nucleossomas. Cada nucleossoma consiste num octâmero que contém duas cópias das histonas celulares – H2A, H2B, H2 e H4 (Louie, 1975). Após a infecção, o minicromossoma é transcrito e está associado à histona H1.

A partir do genoma do JCV e do BKV são produzidos pelo menos cinco transcritos de RNA mensageiro. Antes da replicação viral são transcritos da região precoce (no sentido dos ponteiros do relógio) dois RNAm que codificam os antígenos T grande e t pequeno. Após a fase da replicação viral, são transcritos da região tardia (no sentido contrário ao movimento dos ponteiros do relógio) três RNAm que codificam as proteínas da cápside e a agnoproteína.

A partir do genoma do JCV há a formação de um pré-RNAm que por *splicing* alternativo origina, geralmente, dois transcritos de RNAm precoce que codificam o antígeno T grande e o antígeno t pequeno. No entanto, já foi descrita a presença de outros transcritos de RNAm que codificam antígenos diferentes e que teriam sido originados a partir de mecanismos de *splicing* alternativo (Trowbridge and Frisque, 1995; Prins and Frisque, 2001). Relativamente aos transcritos de RNAm tardio, o JCV

pode apresentar quatro tipos – M1 a M4. Os diferentes padrões de *splicing* na sequência *leader* (sequência a montante da *open reading frame* – ORF – para as proteínas da cápside) determinam a presença ou ausência da ORF da agnoproteína. A maioria dos transcritos de RNAm tardio não sofre *splicing* na sequência *leader* e por isso a ORF da agnoproteína é codificada. O transcrito M1 traduz a agnoproteína, a VP2 e a VP3. Do transcrito M2 resulta a agnoproteína e a VP1. E dos transcritos M3 e M4, gerados a partir de diferentes locais de *splice* (nucleótido 1583 ou nucleótido 1952), resulta uma proteína VP1 incompleta. Os transcritos M3 e M4 são tipos de RNAm únicos em JCV (figura 7) (Shishido-Hara *et al.*, 2000). A tradução da VP2 e da VP3 ocorre a partir de códons *start* alternativos do mesmo transcrito de RNAm. A jusante da sequência que codifica a agnoproteína localiza-se a sequência que codifica VP2 e VP3. A totalidade da sequência de VP3 sobrepõe parte da sequência de VP2 e de VP1, sendo que a sequência codificante de VP3 é idêntica em dois-terços à sequência do terminal carboxilo de VP2. O terminal carboxilo das sequências codificantes de VP2 e VP3 sobrepõe parcialmente o terminal amino de VP1 (figura 7) (Shishido-Hara and Nagashima, 2001).



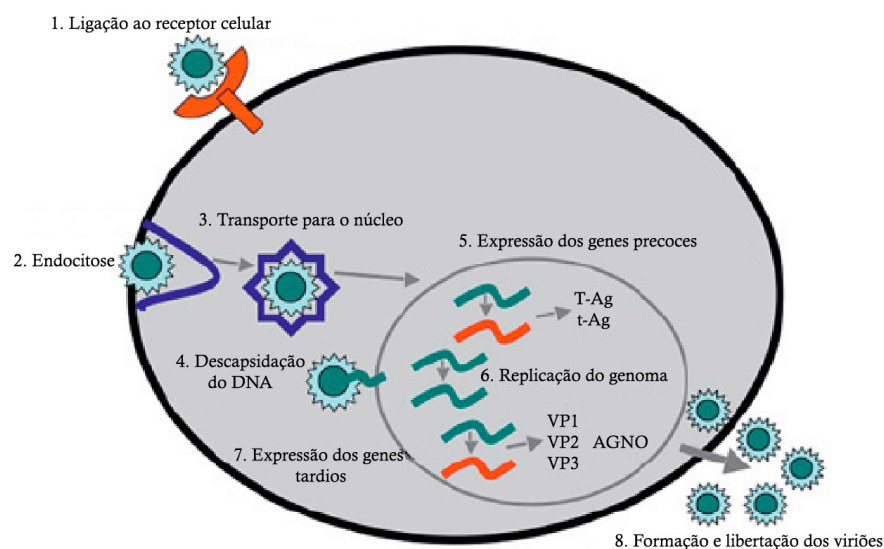
**Figura 7.** Representação esquemática dos tipos de RNA mensageiro transcritos do genoma do JCV (Mad-1) (M1 – codifica a agnoproteína, a VP2 e a VP3; M2 – codifica a agnoproteína e a VP1; M3 – codifica a agnoproteína e uma potencial ORF; M4 – codifica a agnoproteína e uma nova potencial ORF) (adaptado de Shishido-Hara *et al.*, 2000).

A partir do estudo dos transcritos de RNAm do SV40 foi possível identificar os transcritos de RNAm do BKV responsáveis pela expressão das suas proteínas. No SV40 o transcrito de RNAm precoce que codifica para os antígenos T grande e t pequeno é o 19S, enquanto que os transcritos que codificam para as proteínas tardias são o 16S e o 19S. A ORF da agnoproteína é codificada por 80% do RNAm 16S (64% do RNA tardio total) e por 5% do RNAm 19S (1% do RNA tardio total) (Good *et al.*, 1988). A VP1 é produzida pelo RNAm 16S, e VP2 e VP3 são produzidas pelo RNAm 19S, tanto na presença como na ausência da ORF da agnoproteína. Da região precoce do genoma do BKV é produzido um pré-RNAm que por *splicing* origina dois transcritos (19S) que codificam as proteínas precoces (T-Ag e t-Ag). As proteínas tardias são originadas a partir de três transcritos de RNAm: o 19S, que codifica a VP2; o 18S, que codifica a VP3, e o 16S que codifica a VP1 (Seif *et al.*, 1979a; Srivatsan *et al.*, 1981).

O nível de expressão das proteínas da cápside corresponde, aproximadamente, ao *ratio* de proteínas incorporadas nos viriões. Após o processo de tradução, as proteínas sintetizadas no citoplasma são transportadas para o núcleo para a formação dos viriões. A formação da cápside e a maturação de novos viriões ocorre no núcleo, sendo assim necessário que as proteínas VP1, VP2 e VP3 sejam transportadas do citoplasma para o núcleo. O pentâmero VP1 pode associar-se com VP2 ou VP3, formando um complexo estequiométrico específico, que pode integrar parte da cápside, sendo posteriormente adicionado numa estrutura completa. O transporte nuclear é provavelmente o primeiro contacto entre as proteínas da cápside, antes da sua formação na totalidade (figura 8) (Shishido-Hara and Nagashima, 2001).

O ciclo replicativo tem a duração de cerca de 36 a 44 horas e as partículas virais maduras são libertadas aquando da lise celular.





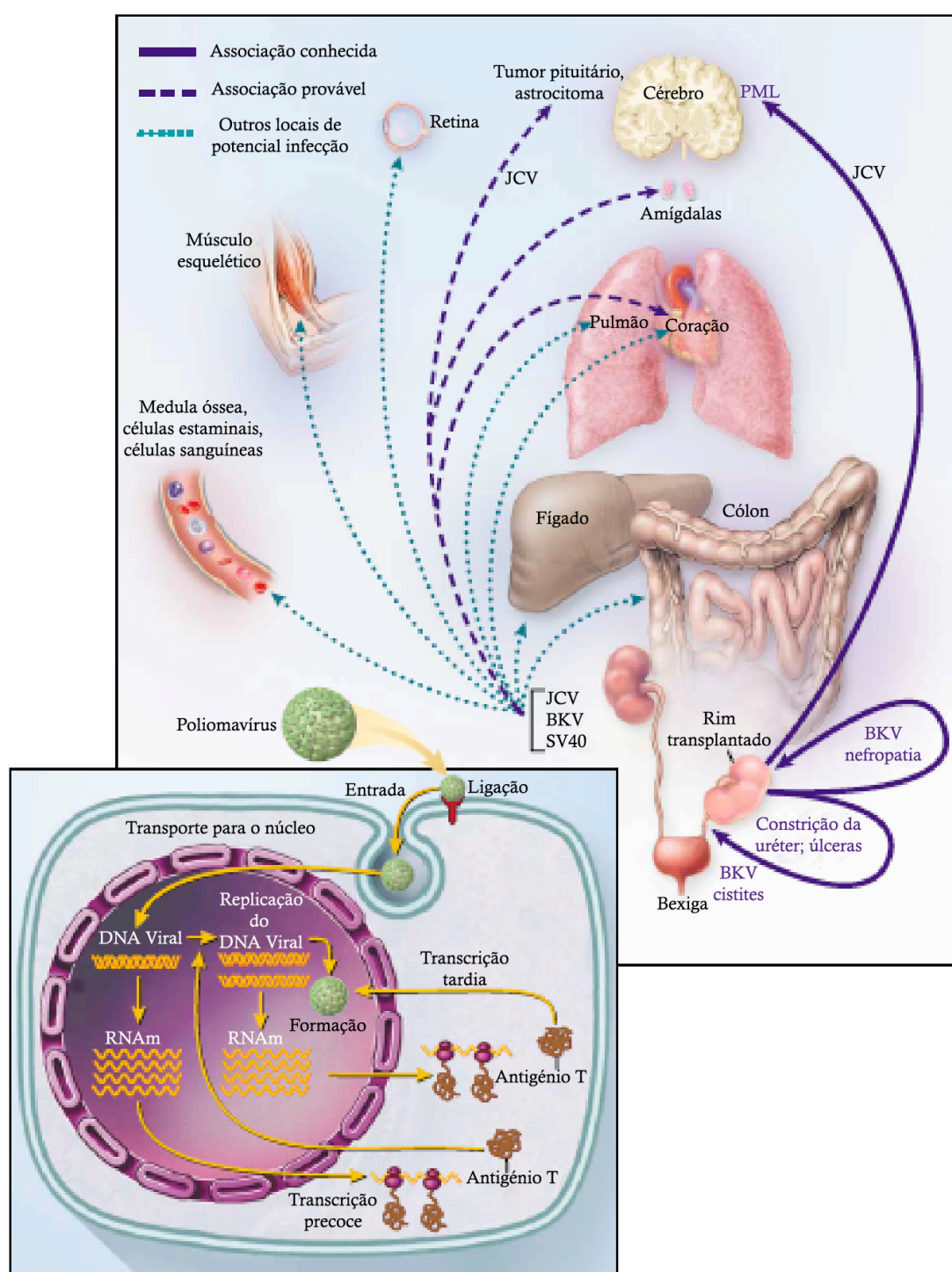
**Figura 8.** Representação esquemática do ciclo de vida do poliomavírus numa célula permissiva. O ciclo de vida inicia-se com a ligação do vírus ao receptor celular (1). Depois da interacção inicial, o vírus entra no citoplasma da célula por endocitose (2). O vírus é transportado para o núcleo (3) onde a descapsidação ocorre (4) para expor o genoma para a expressão dos genes precoces (5). A síntese do DNA viral (6) precede a produção das proteínas tardias (7), permitindo a formação de novos viriões, que são libertados no exterior (8), completando a infecção (adaptado de Eash *et al.*, 2006).

## 2. INFECÇÃO PRIMÁRIA E REACTIVAÇÃO

A infecção primária por poliomavírus ocorre durante a infância, através da rota respiratória ou gastrointestinal. Geralmente é assintomática, mas pode estar eventualmente associada a doenças do tracto respiratório ou urinário (Goudsmit *et al.*, 1982; Sundsfjord *et al.*, 1994). Após a infecção, o vírus persiste nos rins, no sangue periférico, no cérebro (Chesters *et al.*, 1983; Dorries *et al.*, 1994), nos linfócitos-B e em células epiteliais do tracto urinário (Randhawa *et al.*, 2001). De acordo com alguns autores (Schneider and Dorries, 1993; Ferrante *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000), o BKV e o JCV estão presentes em células sanguíneas de indivíduos imunodeprimidos.

Durante as infecções primárias do BKV, e presumivelmente do JCV, a replicação viral ocorre inicialmente no tracto respiratório superior, seguindo-se a virémia e infecção das células renais (Markowitz *et al.*, 1993; Nickeleit *et al.*, 2000). A duração ou intensidade da replicação viral varia com o grau de imunossupressão (figura 9).

Em condições de imunidade reduzida, como a gravidez (Chesters *et al.*, 1983), a existência de doença oncológica (Laghi *et al.*, 1999; Ricciardiello *et al.*, 2001), infecção por HIV (*human immunodeficiency virus*) (Markowitz *et al.*, 1993; Sundsfjord *et al.*, 1994), diabetes (Dorries, 1996) ou transplantação de órgãos, pode ocorrer a reactivação do vírus, causando doença. Em doentes transplantados de células progenitoras hematopoiéticas, a reactivação do BKV contribui para o aparecimento da cistite hemorrágica, enquanto que nos receptores de transplante renal pode ocorrer o desenvolvimento de hematúria e nefrite intersticial, entre outras complicações no tracto urinário. Todas estas complicações podem de alguma forma contribuir para a falência do transplante (Binet *et al.*, 1999; Nickeleit *et al.*, 1999; Mylonakis *et al.*, 2001). Ao ser reactivado, o JCV pode induzir doença a nível neurológico, denominada de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva, que consiste na destruição da mielina resultando numa infecção lítica dos oligodendrócitos no cérebro. Esta doença ocorre usualmente em idades mais avançadas, mas tem sido frequentemente observada em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Hurley *et al.*, 2003; Wyen *et al.*, 2004; Vendrely *et al.*, 2005).



**Figura 9.** Representação esquemática da infecção e replicação do BKV e do JCV. Estes vírus infectam células dos rins, do cérebro, do fígado, da retina, dos pulmões, do sangue, dos gânglios linfáticos, do coração, do músculo e células endoteliais vasculares. As partículas virais depois de entrarem no núcleo da célula hospedeira replicam-se e formam novas partículas virais (RNAm-RNA mensageiro) (adaptado de Fishman, 2002).

Nos indivíduos submetidos a transplantação, a conversão de uma infecção latente numa infecção activa é influenciada por vários factores:

- pelos efeitos individuais ou combinados dos vários agentes imunossupressores (Binet *et al.*, 1999);
- pela função imunológica anti-viral do hospedeiro, que ainda não está totalmente clarificada para os poliomavírus (Cole and Conzen, 2001);
- pela carga viral existente no hospedeiro (Fishman, 2002);
- pelas características microbiológicas específicas do vírus (Fishman, 2002);
- pela estimulação alogénica das histocompatibilidades do próprio enxerto renal, geralmente com rejeições recorrentes (Binet *et al.*, 1999; Nickleit *et al.*, 2000; Fishman, 2002).

Na literatura estão descritos valores muito variáveis para a percentagem de excreção do BKV e do JCV na urina. Em indivíduos com doença oncológica, transplantados de células progenitoras hematopoiéticas e com infecção por HIV, a percentagem de excreção do BKV na urina varia entre 20-90% e a do JCV entre 16-67%; na urina de grávidas, a excreção do JCV e do BKV é de 7% e de 15-47%, respectivamente, e em pacientes submetidos a transplante renal a incidência na urina para ambos os vírus varia entre 14-65% (Arthur *et al.*, 1986; Markowitz *et al.*, 1991; Cotterill *et al.*, 1992; Priftakis *et al.*, 2000).

A cistite hemorrágica é causa importante de morbilidade e mortalidade nos doentes submetidos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas e a sua incidência varia entre 7 e 68% (Sencer *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1994).

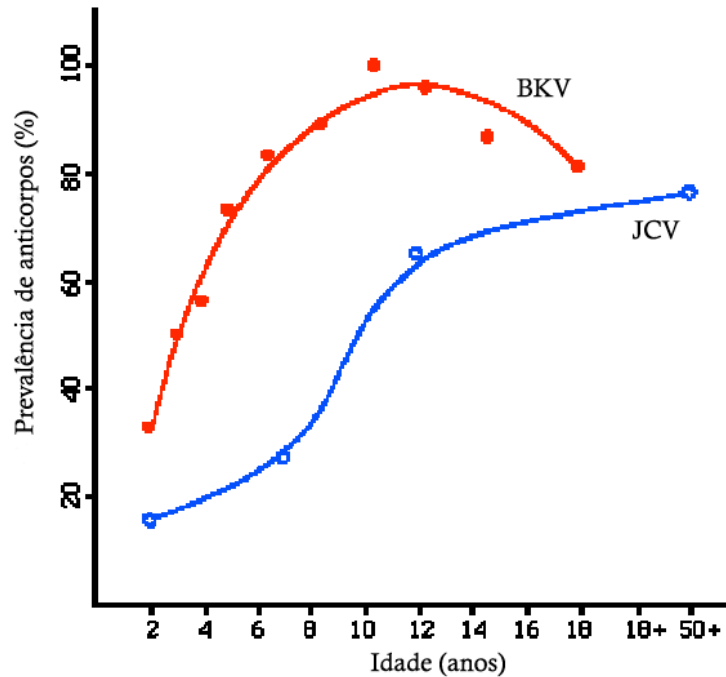
Alguns investigadores acreditam que a imunossupressão pode contribuir para a reactivação do JCV, devido a alterações da região reguladora durante a replicação do DNA viral. Outros autores, no entanto, acreditam que a perda da imunidade específica das células que controlam a infecção activa ou a replicação viral resulta na reactivação (Seth *et al.*, 2003).

### 3. EPIDEMIOLOGIA E SEROLOGIA

A infecção por poliomavírus é ubíqua, tendo sido detectados anticorpos específicos para o BKV e para o JCV em cerca de 80 a 100% da população em geral (Shah *et al.*, 1973).

Foram detectados anticorpos específicos para o BKV em populações de diferentes partes do mundo, como por exemplo na Europa, no Norte e Sul da América, na Austrália, em África, no Sul do Pacífico e no Irão (Gardner and Knowles, 1995), sendo raro apenas em algumas tribos do Sul da América e da Malásia. Relativamente ao anticorpo específico para o JCV, este foi detectado em populações da Inglaterra, da Índia, da Malásia, do Sul do Pacífico e do Norte e Sul da América (Padgett and Walker, 1976).

Uma vez que é na infância o primeiro contacto com os poliomavírus, realizaram-se estudos serológicos em crianças, demonstrando-se que mais de 50% das crianças possuem anticorpos específicos para os vírus BK e JC, aos 3 e 10-14 anos de idade, respectivamente (Flaegstad *et al.*, 1986). Posteriormente, durante a adolescência, esta percentagem aumenta para cerca de 60 a 90% (Walker and Padgett, 1983). Nos adultos há um ligeiro decréscimo na seroprevalência dos anticorpos para o BKV, enquanto que para o JCV aumenta, até atingir 70-80% dos dois anticorpos nos adultos (figura 10) (Walker and Padgett, 1983).



**Figura 10.** Relação entre a idade e a prevalência dos anticorpos específicos para o BKV e para o JCV (adaptado de Frisque, 1999).

Após a infecção primária, desenvolve-se uma resposta humoral por parte do sistema imunitário do hospedeiro. Os anticorpos específicos para estes vírus são Imunoglobulinas M (IgM) e Imunoglobulinas G (IgG). Esta última persiste durante a vida do hospedeiro. Nos indivíduos com infecção activa ou reactivada, os níveis dos anticorpos estão usualmente muito altos e mantêm-se elevados, uma vez que o indivíduo é capaz de dar uma resposta humoral normal (Coleman *et al.*, 1980). Os anticorpos IgM específicos são produzidos não só durante as infecções primárias mas também nas secundárias e persistem por longos períodos, sugerindo uma estimulação antigénica contínua (Gardner and Knowles, 1995).

É evidente que a imunidade celular mediada desempenha um papel importante no controlo da replicação viral, visto que a reactivação ocorre na presença de um anticorpo viral específico.

#### 4. FORMAS DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS E PROPAGAÇÃO NO HOSPEDEIRO

Os mecanismos de transmissão e propagação dos poliomavírus e a sua interação com as células hospedeiras são pouco conhecidas. A transmissão do BKV e do JCV ocorre apenas entre os humanos, e não existe nenhuma evidência da existência de um reservatório animal (Padgett and Walker, 1976). Questões acerca da transmissão congénita e dos seus efeitos nos fetos mantêm-se, ainda, sem resposta. Alguns estudos apresentam possíveis locais de entrada do BKV, nomeadamente através da placenta (Pietropaolo *et al.*, 1998). O DNA do BKV foi encontrado nos tecidos genitais masculinos e femininos e em esperma humano, sugerindo que a transmissão sexual pode ser uma via alternativa para a infecção primária (Monini *et al.*, 1996). Após a infecção primária, parece que o BKV se dissemina pelo corpo através da corrente sanguínea (Dorries *et al.*, 1994). Alguns autores detectaram a presença do BKV em plasma de pacientes submetidos a transplante renal, em que a biópsia era negativa para a presença de BKV. Uma possível explicação será que o vírus alcança a circulação sanguínea pelo meio de capilares peritubulares adjacentes (Nickeleit *et al.*, 2000; Randhawa *et al.*, 2004). O JCV, que infecta cerca de 90% da população humana, pode disseminar-se pelo corpo através dos linfócitos (Gallia *et al.*, 1997). Provavelmente aloja-se no rim, visto ser detectado na urina de indivíduos saudáveis, bem como em pacientes com leucoencefalopatia multifocal progressiva (Daniel *et al.*, 1996).





---

## OBJECTIVOS

Este trabalho foi dividido em duas fases com os seguintes objectivos:

### Fase I

Detectar poliomavírus, nomeadamente o BK vírus e o JC vírus, recorrendo a técnicas de biologia molecular – *Polymerase Chain Reaction* e *Restriction Fragment Length Polymorphism* – em amostras de urina de doentes submetidos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas e em indivíduos saudáveis – dadores de sangue.

### Fase II

Elaborar e otimizar um protocolo para detectar transcritos de RNA mensageiro precoce e tardio do BK vírus, recorrendo à técnica de *Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction* para permitir distinguir entre uma infecção latente e uma infecção activa.



---

## MATERIAL E MÉTODOS

A Fase I deste trabalho foi realizada no Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil – Porto (IPO – Porto), no Grupo de Oncologia Molecular do Centro de Investigação e no Serviço de Virologia, sob orientação do Prof. Doutor Rui Medeiros.

A Fase II foi efectuada no Institut für Virologie und Immunbiologie – Julius-Maximilians Universität Würzburg, no Grupo dos Poliomavírus, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Doutora Kristina Doerries, durante o período de Outubro a Dezembro de 2005.

### Fase I

#### População

Nesta fase foram analisados dois grupos diferentes, num total de seiscentos e sessenta oito (668) amostras. Todas as amostras de urina foram obtidas no Departamento de Imuno-Hemoterapia e na Unidade de Transplantação de Medula Óssea do IPO – Porto.

#### *Indivíduos saudáveis*

O primeiro grupo analisado consistiu em quatrocentos e noventa e oito (498) indivíduos dadores de sangue com uma idade média de 40.29 anos, desvio padrão (dp) de 12.13 e mediana de 41 anos. Duzentos e treze (213) indivíduos são do sexo feminino com uma idade média de 38.97 anos, desvio padrão de 12.32 e mediana de

40 anos. Os restantes duzentos e oitenta e cinco (285) indivíduos pertencem ao sexo masculino com uma idade média de 41.29 anos, desvio padrão de 11.90 e mediana de 42 anos.

#### *Pacientes sujeitos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas*

O segundo grupo estudado consistiu em cento e setenta (170) amostras correspondentes a trinta e quatro (34) pacientes que tinham sido submetidos à transplantação de células progenitoras hematopoiéticas, com uma idade média 36.53 anos, desvio padrão de 15.30 e mediana de 37.50 anos. Ao sexo feminino pertencem 12 pacientes (35.3%) com uma idade média de 41.08 anos, desvio padrão de 13.56 e mediana de 46 anos. Vinte e dois pacientes (64.70%) são do sexo masculino com uma idade média de 34.05 anos, desvio padrão de 15.92 e mediana de 36.50 anos. Todos os valores referidos foram obtidos com base nos dados do primeiro transplante.

#### Extracção do DNA viral

Para o isolamento do DNA viral de todas as amostras de urina recorreu-se ao kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid Roche (Roche Applied Science). Após a extracção, o DNA viral foi armazenado a 4°C quando para uso imediato e a -20°C para trabalhos posteriores. Algumas das amostras de DNA foram sujeitas a uma reacção de relaxamento com a enzima Topoisomerase I, durante 30 minutos a 37°C, para desenrolar a cadeia de DNA do poliomavírus. A reacção de relaxamento com um volume final de 50µl consistiu em 1U de Topoisomerase I (Invitrogen), tampão de PCR 1x (MBI Fermentas), 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas) e 0.2µg de DNA viral (baseado em Laghi *et al.*, 1999; Ricciardiello *et al.*, 2000; Laghi *et al.*, 2004).

### Amplificação do DNA viral por *Polymerase Chain Reaction*

Para confirmar a presença de DNA nas amostras após a extracção, aplicou-se a técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com *primers* para o gene da ciclina D1 (Betticher *et al.*, 1995). A reacção foi feita num termociclador programável, com um volume final de 50µl, consistindo aproximadamente em 0.2µg de DNA viral, 1U de *Taq* DNA Polymerase (MBI Fermentas, #EP0402) e o respectivo tampão de reacção 1x, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas), 0.2mM de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTP) (MBI Fermentas, #R0192) e 0.3µmol de cada *primer*:

F: 5' GTC AAG TTC ATT TCC AAT CCG C 3'

R: 5' GGG ACA TCA CCC TCA CCC TCA CTT AC 3'

As condições da reacção incluíam uma pré-desnaturação de 10 minutos a 95°C para activação da *Taq* DNA Polymerase, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, com um passo de extensão final de 2 minutos a 72°C. Na reacção utilizou-se um controlo negativo e um controlo positivo.

### Amplificação do DNA do poliomavírus por *Polymerase Chain Reaction*

A sequência amplificada através da técnica de PCR localiza-se na região codificante para o antígeno T grande. Na presença de DNA do BKV e do JCV, o fragmento amplificado possui 176 e 173 pares de base, respectivamente. A reacção foi efectuada num termociclador programável, com um volume final de 50µl, consistindo aproximadamente em 0.2µg de DNA viral, 1U de *Taq* DNA Polymerase (MBI Fermentas, #EP0402) e o respectivo tampão de reacção 1x, 1.5mM MgCl<sub>2</sub> (MBI

Fermentas), 0.2mM de desoxinucleosídeos trifosfato (MBI Fermentas, #R0192) e 0.4µM de cada *primer*.

PEP-1 – F: 5' AGT CTT TAG GGT CTT CTA CC 3'

PEP-2 – R: 5' GGT GCC AAC CTA TGG AAC AG 3'

Em JCV e BKV, o *primer* PEP-1 emparelha na posição 4255-4274 e 4392-4411, respectivamente, e o *primer* PEP-2 na posição 4408-4427 e 4548-4567 do JCV e do BKV, respectivamente.

As condições da reacção incluíam uma pré-desnaturação de 10 minutos a 95°C para activação da *Taq* DNA Polymerase, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, *annealing* a 55°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos, com um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C (baseado em Arthur *et al.*, 1989). Na reacção de PCR utilizou-se um controlo negativo e um controlo positivo para poliomavírus – DNA do JCV (Mad-1) – que foi gentilmente cedido pela Dra. Ana Matos (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra).

#### Visualização do fragmento amplificado

De modo a verificar se houve ou não amplificação do fragmento de DNA desejado, 12µl dos produtos de PCR juntamente com 2µl de corante (*Loading Dye* – Gibco BRL 10816-015) foram analisados por electroforese em géis de agarose a 1.5% (p/v), corados com 5% de brometo de etídeo. Os géis foram visualizados, utilizando uma lâmpada luz ultra-violeta, no aparelho *Image Master VDS* – *Pharmacia Biotech*.

### Identificação do BKV e JCV por *Restriction Fragment Length Polymorphism*

As amostras positivas para a presença do poliomavírus foram submetidas à técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Com um volume final de 50µl, 15µl dos produtos do PCR foram submetidos a digestão enzimática com 10U de *Bam*HI (Fermentas #ER0051) e respectivo tampão, durante 16 horas a 37°C. Esta enzima de restrição corta na presença da seguinte sequência:



### Visualização dos fragmentos obtidos por *Restriction Fragment Length Polymorphism*

Os fragmentos obtidos por RFLP foram analisados em electroforese em géis de agarose a 3% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob a luz ultravioleta. A presença de uma banda de 176 pb significa que esta não foi cortada pela enzima e corresponde à presença do BKV. A existência de duas bandas, uma com 53 pb e outra com 120 pb, indica a presença do JCV na amostra. O produto de PCR que corresponde ao controlo positivo foi também digerido originando duas bandas, como previsto.

### Tratamento estatístico

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio dos programas estatísticos *Statistical Package for Social Sciences* para Macintosh OS X (SPSS versão 11.0.4).

A análise pelo teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizada para comparação das variáveis categóricas. O valor de p foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  e foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0.05. Também se utilizou o teste do t-Student para comparação das médias. O valor *Odds Ratio* (OR) indica o factor de risco para determinado acontecimento num estudo do tipo caso-controlo, e foi calculado juntamente com o seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para avaliar o risco de excreção dos poliomavírus no grupo de doentes comparativamente com o grupo de indivíduos saudáveis.

## **Fase II**

Nesta fase elaborou-se um protocolo para a detecção do RNA mensageiro do BKV recorrendo-se à técnica de *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*. As células submetidas à infecção pelo vírus BK (Dunlop) foram os *African Green Monkey cells* (células Vero) provenientes do rim deste animal.

### Cultura celular e Infecção por BK vírus

#### *Manutenção das células Vero em cultura*

As células Vero são células aderentes que crescem em monocamadas confluentes e foram mantidas numa incubadora (Heraeus instruments) a 37°C com uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. O meio de cultura é preparado no Institut für Virologie und Immunbiologie e é composto por:

- MEM (*Minimum Essential Medium*);
- 5% FCS (*Fetal Calf Serum*);



- 2.2g/l NaHCO<sub>3</sub>;
- 2.5mM L-Glutamina;
- 0.1% Penicilina/Estreptomicina (adicionou-se 0.5ml de Penicilina/Estreptomicina a 500ml de meio de cultura).

A substituição do meio de cultura efectuou-se uma a duas vezes por semana, dependendo do crescimento observado e/ou do facto de o meio apresentar a cor característica para ausência de nutrientes (amarelo escuro). Para a substituição do meio de cultura este foi retirado e lavaram-se as células com cerca de 10ml de ATV (*Antibiotics Trypsin Versene*) (anexo I). Incubou-se 5 a 10 minutos a 37°C, para que as células perdessem a aderência às paredes do frasco e entre si. Adicionou-se cerca de 6ml de novo meio e ressuspenderam-se as células que eram divididas num *ratio* de 1:6 em novos frascos. Estes foram preenchidos com 50ml de meio de cultura. Após duas passagens, recomenda-se a transferência das células para um novo frasco para evitar o agrupamento das células.

#### *Infecção por BK vírus*

Ao longo do trabalho realizaram-se duas experiências, em diferentes períodos. Na primeira experiência (1º infecção), utilizou-se um frasco controlo com células Vero não infectadas e cinco frascos com células Vero infectadas. No novo meio de cultura a quantidade de FCS foi reduzida de 5% para 2.5% para prevenir o crescimento rápido das células. Um dia antes de se iniciar o processo de infecção, retiraram-se da cultura *stock* as células Vero necessárias, que foram colocadas em novos frascos com MEM (2.5% FCS).

No dia em que se iniciou o processo de infecção, colocou-se num falcon 5ml do meio de cultura (2.5% FCS) e adicionou-se 250µl do *stock* de vírus. Desta solução retirou-se 1ml para cada frasco, com excepção do frasco controlo, ao qual se adicionou 1ml do meio de cultura. Previamente, tinha sido retirado o meio de cultura antigo. Os frascos foram colocados num agitador (2 movimentos por minuto) numa

sala a 37°C, durante 2 horas. Após este período de incubação, adicionou-se 6ml de meio a cada frasco e foram colocados na incubadora a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>.

Este procedimento repetiu-se na segunda experiência (2º infecção), utilizando-se uma solução com 7.2ml do meio de cultura (MEM + 2.5%FCS) e 800µl da diluição de 1:1000 do stock vírus. Utilizou-se uma diluição do vírus porque se verificou na infecção da primeira experiência que nem todas as células foram infectadas e que outras teriam tido uma infecção muito rápida, sugerindo que a infecção não tinha sido gradual nem uniforme. Na infecção da segunda experiência utilizaram-se sete frascos de células Vero infectadas e um frasco controlo.

Todos os dias se observaram ao microscópio os frascos com as células infectadas e o frasco controlo para avaliação da progressão da infecção e registo da mesma, isto em ambas as experiências.

#### Extracção do RNA total e tratamento da amostra com a enzima *DNase*

##### *Contagem das células*

A infecção por BKV origina alterações morfológicas nas células, nomeadamente o aumento progressivo do núcleo celular – *oval eyes* – e através da observação microscópica é possível avaliar essas alterações, o que permitiu seleccionar os frascos, de acordo com os objectivos propostos.

Do frasco seleccionado retirou-se o meio de cultura que foi colocado num falcon e adicionou-se 3ml de ATV para soltar as células que permaneciam na parede. Posteriormente retirou-se o ATV dos frascos e adicionou-se 5ml do meio de cultura, retirando-se as células em suspensão para o falcon. Após centrifugar 5 minutos a 1600rpm, retirou-se o sobrenadante. Adicionou-se 5ml de PBS (*Phosphate buffered saline*) ao precipitado e centrifugou-se 5 minutos a 1600rpm e retirou-se novamente o sobrenadante. Este passo foi repetido mais uma vez.

Para a contagem das células preparou-se uma solução:

- 10 $\mu$ l solução de células + 90 $\mu$ l PBS + 10 $\mu$ l Trypanblue  $\Rightarrow$  muita quantidade de precipitado
- 100 $\mu$ l solução de células + 10 $\mu$ l Trypanblue  $\Rightarrow$  pequena quantidade de precipitado

Colocou-se 10 $\mu$ l da solução anterior numa câmara de Neubauer e contaram-se as células ao microscópio. O número final de células é a média da soma das células dos 4 quadrados  $\times 10^4$  células/ml.

#### *Extracção do RNA total*

A extracção do RNA total foi efectuada com o kit comercial Versagene Total RNA Purification Kit (Gentra Systems). Ao precipitado do falcon adicionou-se solução de lise e  $\beta$ -Mercaptoethanol e colocou-se no vortex durante 2 minutos. Após a extracção, mediu-se a concentração do RNA total recorrendo a um espectofotómetro Pharmacia. Para calibração do aparelho utilizou-se como branco 100 $\mu$ l 10mM TRIS-HCl e mediu-se a concentração de cada amostra numa solução com 99 $\mu$ l 10mM TRIS-HCl e 1 $\mu$ l do RNA total extraído.

#### *Tratamento das amostras com a enzima DNase*

A amostra do RNA total foi tratada com a enzima *DNase* recorrendo ao kit comercial RQ1 RNase-Free DNase (Promega), para excluir qualquer contaminação de DNA. De acordo com as indicações do kit, deve-se usar 1U da RNase-Free DNase por cada  $\mu$ g de RNA. Fizeram-se algumas alterações ao protocolo da Promega, nomeadamente não se adicionou 1 $\mu$ l de RQ1 DNase stop solution e incubou-se 10 minutos a 75°C.

De células Vero não infectadas também se extraiu RNA total e a concentração obtida em RNA total/milhão de células foi utilizada como controlo e como valor de comparação para ambas as infecções, apesar de cada infecção ter tido um frasco controlo.

### Síntese de DNA complementar a partir do RNA mensageiro

As amostras do RNA total tratadas foram submetidas à técnica de *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) para a obtenção de DNA complementar (DNAc), usando o kit comercial SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen). Em cada reacção utilizou-se 8µl do RNA total tratado com DNase, 50µM de oligo(dT)<sub>20</sub> e 10mM de dNTP para um volume final de 10µl. Utilizaram-se os *primers* oligo(dT)<sub>20</sub>, porque estes emparelham na região poly(A) do RNAm, garantindo, assim, que o único RNA convertido em DNAc é o RNAm. O restante protocolo foi efectuado de acordo com as indicações do kit. As reacções da síntese do DNAc podem ser armazenadas a -20°C ou utilizadas para PCR imediatamente. Algumas das amostras de DNAc foram purificadas utilizando-se o kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

Seguidamente fez-se um PCR com os *primers* para o gene *housekeeping* da beta-actina (β-actina) humana. A reacção de PCR tinha como volume final 50µl, consistindo aproximadamente em 1µl de DNAc, 1U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e o respectivo tampão de reacção 1x, 2.5mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.05% de WP 1% (Invitrogen), 20mM de cada nucleótido (A, G, C, T) (Invitrogen) e 10µM do *primer sense* (GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC) e do *primer antisense* (CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C) (Invitrogen). O controlo positivo da reacção foi DNAc de células HL60.

O fragmento amplificado a partir do produto do RT-PCR tem 353 pares de base. As condições da reacção incluíam uma pré-desnaturação de 2 minutos a 94°C para activação da *Taq* DNA Polymerase, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C

durante 15 segundos, *annealing* a 55°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos obtidos por PCR foram analisados em electroforese em géis de agarose a 2% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob a luz ultravioleta.

### Amplificação do DNAc por *Polymerase Chain Reaction*

Amplificaram-se duas sequências na região codificante para o antígeno T grande e uma sequência na região codificante para a proteína VP1.

No caso da região codificante para o antígeno T grande, utilizou-se em todas as reacções de PCR um controlo positivo – vector de DNA do BKV (corte de restrição para *Bam*HI) – e um controlo negativo. Todas as reacções tinham como volume final 50µl e foram realizadas num termociclador *PTC 200* da MJ Research. Cada reacção consistiu aproximadamente em 1µl de DNAc, 1U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e o respectivo tampão de reacção 1x, 3mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.05% de WP 1%, 20mM de cada nucleótido (A, G, C, T) (Invitrogen) e 5pmol do *primer* 307/308 e 309/310 (tabela 1).

O fragmento amplificado com os *primers* 307 e 308 a partir do vector de DNA tem 888 pares de base e a partir do DNAc tem 543 pares de base, visto que a sequência que estes *primers* amplificam contém dois locais de *splicing*. O fragmento resultante da amplificação com os *primers* 309 e 310 tanto a partir do DNAc como do vector de DNA tem 676 pares de base. Depois do PCR, efectuou-se um *semi-nested* PCR (sn-PCR) com o *primer* 310 e *primer* 311 (tabela 1).

O fragmento resultante tem 409 pares de base tanto para o DNAc como para o vector de DNA. Todas as reacções referidas apresentaram as mesmas condições para o PCR, com uma pré-desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 50°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Relativamente à região codificante para a proteína VP1, amplificou-se apenas uma sequência. O controlo positivo consistiu num vector de DNA do BKV (Dun) (corte de restrição para *EcoR*I). A reacção de PCR tinha como volume final 50µl, consistindo aproximadamente em 1µl de DNAc, 1U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) e o respectivo tampão de reacção 1x, 3mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 0.05% de WP 1%, 20mM de cada nucleótido (A, G, C, T) (Invitrogen) e 5pmol do *primer* 313 e *primer* 314 (tabela 1).

O fragmento resultante tem 471 pares de base tanto para o DNAc como para o vector de DNA. As condições da reacção incluíam uma pré-desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 55°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C. Depois deste PCR, efectuou-se um *semi-nested* PCR com o *primer* 249 e o *primer* 314 (tabela 1).

O fragmento resultante tem 161 pares de base tanto para o DNAc como para o vector de DNA. As condições da reacção incluíam uma pré-desnaturação de 2 minutos a 94°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, *annealing* a 51°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Todos os produtos obtidos através da técnica de PCR foram analisados em electroforese em géis de agarose a 2% (p/v), corados com brometo de etídeo e visualizados sob a luz ultra-violeta.

**Tabela 1.** Sequência dos *primers* utilizados nas reacções de PCR e as regiões amplificadas no DNA e no DNAc.

Nome	Sequência (5' – 3')	Região amplificada no DNA (5' – 3')	Região amplificada no DNAc (5' – 3')
<i>Primer 307</i>	GGA GCA GGA TGT AAA GGT A	4968 – 4950	186 – 204
<i>Primer 308</i>	GTA TGG ATC TCT AGT TAA GGC AC	4081 – 4103	707 – 729
<i>Primer 309</i>	AAA GAC TTT CCC TCT GAT CTA CA	4398 – 4376	412 – 434
<i>Primer 310</i>	GCA TTT CTT CCC TGG TCA TA	3723 – 3742	1087 – 1068
<i>Primer 311</i>	GGG TGT TAA TAA GGA ATA CTT AC	4132 – 4110	—
<i>Primer 313</i>	GCC CAG TCC CAG GTA ATG AAT	2116 – 2136	—
<i>Primer 314</i>	AAG TCT TTC TGT GCC ATC AAA CA	2586 – 2564	—
<i>Primer 249</i>	AGA TCC GCC TGA GAA AA	2426 – 2443	—





---

## RESULTADOS

### Fase I

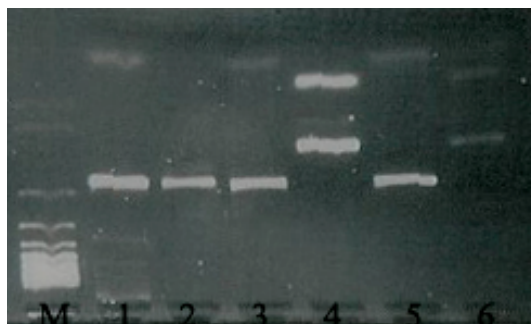
#### Amplificação do DNA do poliomavírus e identificação do BKV e do JCV

Com as 668 amostras de DNA viral obtidas procedeu-se à amplificação da região pretendida com os *primers* PEP-1 e PEP-2. O fragmento resultante tem 176 pb na presença do BKV ou 173 pb na presença do JCV. Na figura 11, encontra-se representado um gel de agarose com algumas das amostras positivas para os poliomavírus.



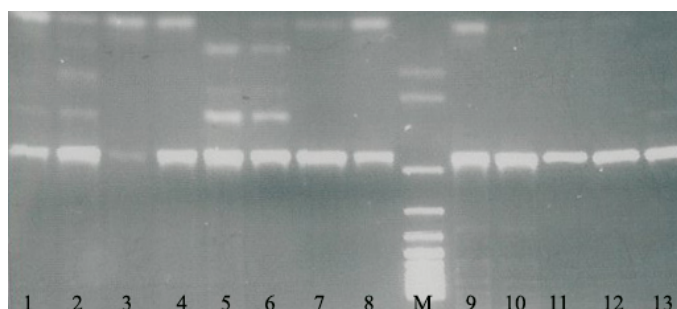
**Figura 11.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* PEP-1 e PEP-2 (M – marcador molecular de 50pb; 1-13 – amostras positivas para os poliomavírus).

Como não é possível distinguir no gel de agarose entre a banda de 173 e de 176 pb, procedeu-se à digestão enzimática do produto de PCR. Na figura 12, estão representados num gel de agarose as amostras positivas para o BKV (176 pb), uma amostra positiva para o JCV e o controlo positivo para o JCV, com duas bandas – 53 pb e 120 pb.



**Figura 12.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à digestão pela enzima *Bam*HI (M – marcador molecular de 100pb; 4 – controlo positivo de DNA do JCV; 1-3 e 5 – amostras positivas para o BKV; 6 – amostra positiva para o JCV).

Algumas amostras eram positivas para o BKV e para o JCV simultaneamente, apresentado três bandas (53 pb, 120 pb e 176 pb) num gel de agarose (figura 13).

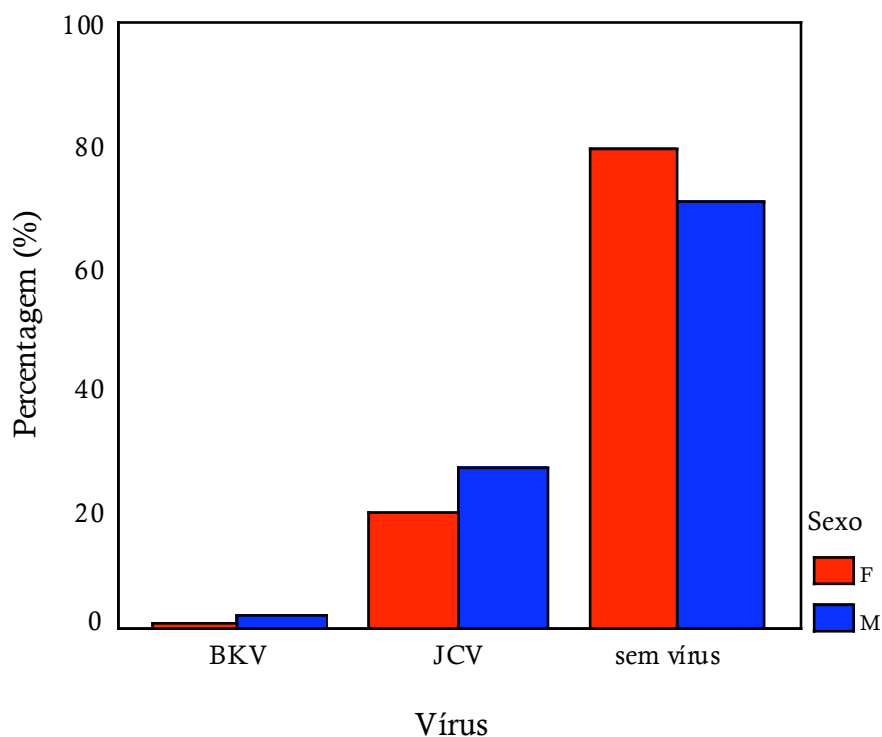


**Figura 13.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à digestão pela enzima *Bam*HI (M – marcador molecular de 100pb; 1-2 e 5-6 – amostras positivas para o BKV/JCV; 3-4 e 7-13 – amostras positivas para o BKV).

### Análise da frequência do poliomavírus na população de indivíduos saudáveis

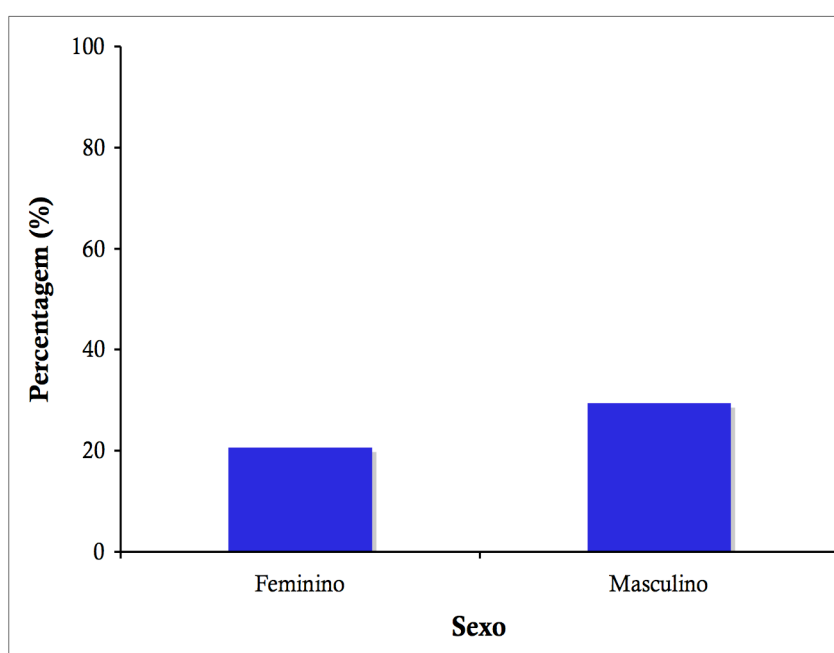
Ao analisar a presença do DNA do poliomavírus nas amostras do grupo de indivíduos saudáveis, verificou-se que 74.3% das amostras (370 em 498) eram negativas para ambos os vírus. O JCV foi detectado na amostra global em 23.9% das amostras (119 em 498) e o BKV foi detectado em apenas 1.8% das amostras (9 em 498). Em nenhuma amostra foi detectada a presença, em simultâneo, de ambos os vírus.

Ao analisarmos por sexo a presença ou ausência dos poliomavírus, verificamos que no sexo masculino 2.5% dos indivíduos são positivos para o BKV (7 em 285), 27% são positivos para o JCV (77 em 285) e 70.5% são negativos para a presença dos poliomavírus (201 em 285). No sexo feminino, 0.9% dos indivíduos são positivos para o BKV (2 em 213), 19.7% são positivos para o JCV (42 em 213) e que 79.3% dos indivíduos (169 em 213) são negativos para os poliomavírus (figura 14).



**Figura 14.** Percentagem de indivíduos saudáveis, do sexo feminino e do sexo masculino, positivos ou negativos para a presença dos poliomavírus.

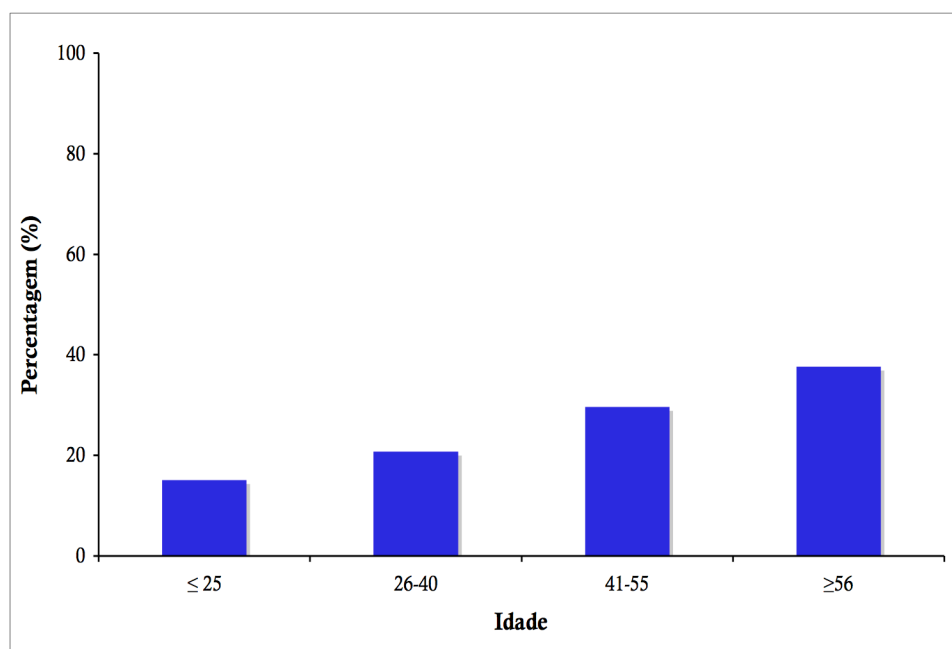
Numa outra análise, dividiram-se os resultados em dois subgrupos, o subgrupo das amostras positivas para a presença dos poliomavírus e o subgrupo das amostras negativas para a presença do poliomavírus, e comparou-se com o sexo dos indivíduos. Nos indivíduos do sexo masculino (285 indivíduos) 29.5% são positivos para os poliomavírus, enquanto que no grupo dos indivíduos do sexo feminino (213 indivíduos) 20.7% são positivos. Os indivíduos do sexo masculino têm um risco acrescido de 1.6 vezes (95% IC 1.05-2.44;  $p=0.026$ ) para a presença dos poliomavírus, comparativamente com os indivíduos do sexo feminino (figura 15).



**Figura 15.** Distribuição dos casos positivos para os poliomavírus (JCV e BKV) pelo sexo, no grupo dos indivíduos saudáveis.

Estratificou-se a amostragem, tendo em conta a variável idade, em quatro subgrupos (intervalos de 15 anos), em que a idade mínima é 18 anos e a máxima 64 anos. O primeiro subgrupo abrange os indivíduos com idade menor ou igual a 25 anos (66 em 498); o segundo subgrupo incluiu indivíduos entre os 26 e os 40 anos (178 em 498); o terceiro subgrupo, indivíduos entre os 41 e os 55 anos (192 em 498), e o último subgrupo, indivíduos com mais de 56 anos (61 em 498). Analisaram-se os quatro subgrupos tendo em conta a frequência dos poliomavírus. Para o primeiro subgrupo

15.2% das amostras foram positivas para o poliomavírus; no segundo subgrupo 20.8% dos casos foram positivos; no terceiro subgrupo 29.7% foram positivos, e no último grupo 37.7% dos indivíduos foram positivos (figura 16).



**Figura 16.** Distribuição dos casos positivos para os poliomavírus (JCV e BKV), de acordo com a faixa etária, no grupo dos indivíduos saudáveis.

A frequência dos poliomavírus vai aumentando progressivamente com a idade, sendo maior nos indivíduos com idades mais avançadas ( $p=0.006$ ). Dentro do subgrupo das amostras positivas para o poliomavírus, não há diferenças estatisticamente significativas na distribuição do vírus JC e BK, no que diz respeito ao sexo e à faixa etária.

Através do teste de *t-Student* compararam-se as médias das idades entre o subgrupo de amostras positivas para a presença do poliomavírus –  $43.3 \pm 12.12$  anos – e o subgrupo de amostras negativas –  $39.3 \pm 11.90$  anos. Estas diferenças são estatisticamente significativas ( $p = 0.002$ ).

### Comparação com outras populações de indivíduos saudáveis

Através da análise estatística, utilizando o teste do  $\chi^2$ , efectuamos uma comparação entre os nossos resultados e as frequências descritas na literatura, referentes às populações Asiáticas (Kitamura *et al.*, 1990; Tsai *et al.*, 1997; Jeong *et al.*, 2004), Europeias (Azzi *et al.*, 1999; Bendiksen *et al.*, 2000; Pagani *et al.*, 2003) e Americanas (Agostini *et al.*, 1996) (tabela 2).

**Tabela 2.** Frequência do JC vírus em várias populações de indivíduos saudáveis.

População	Nº de indivíduos	Positivos para o JCV		p*	Referência
		Nº de indivíduos	Frequência		
Portugal (Região Norte)	498	119	0.24	—	Nosso estudo
Coreia (Kangwon-Do)	100	80	0.80	0.399	Jeong <i>et al.</i> , 2004
Itália (Continente, Sicília e Sardenha)	211	97	0.46	0.000	Pagani <i>et al.</i> , 2003
Itália (Florença)	62	6	0.10	0.019	Azzi <i>et al.</i> , 1999
Japão	38	5	0.13	0.130	Kitamura <i>et al.</i> , 1990
Noruega (grávidas, Sul)	75	0	0.00	0.000	Bendiksen <i>et al.</i> , 2000
Taiwan	75	10	0.13	0.041	Tsai <i>et al.</i> , 1997
Taiwan (grávidas)	46	10	0.22	0.742	Tsai <i>et al.</i> , 1997
U.S.A. (Pensilvânia e Mariland)	105	43	0.41	0.000	Agostini <i>et al.</i> , 1996

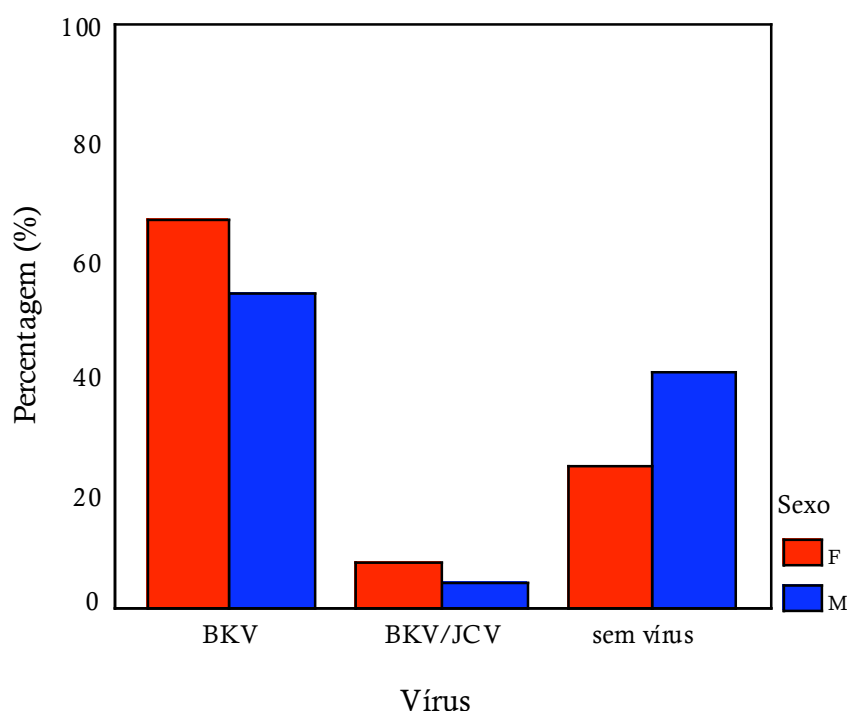
p\* - valor de p, obtido pelo teste do  $\chi^2$ , na comparação da frequência do JCV, entre a nossa população e as restantes

Pela análise da tabela 2, podemos verificar quais as populações que apresentam uma frequência do JCV estatisticamente semelhante ou diferente dos nossos resultados. Sendo assim, verificamos que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os nossos resultados e as populações Coreanas ( $p=0.399$ ), Japonesas ( $p=0.130$ ) e uma população de mulheres grávidas do Taiwan ( $p=0.742$ ).

Pelo contrário, observamos que a frequência do JCV do nosso estudo é diferente da frequência do JCV nas populações Norueguesa ( $p<0.001$ ), Taiwanesa ( $p=0.041$ ), Americana ( $p<0.001$ ) e em duas populações Italianas ( $p<0.001$ ;  $p=0.019$ ).

#### Análise da frequência do poliomavírus nos doentes

Quando se analisou o número de pacientes positivos para os poliomavírus, verificou-se que 58.8% dos pacientes (20 em 34) foram positivos apenas para a presença do BKV. Na urina de 35.3% dos pacientes (12 em 34) não se detectou os poliomavírus e apenas 5.9% dos pacientes (2 em 34) foram positivos simultaneamente, para o BKV e para o JCV. Quando se procedeu à análise por sexos, aferiu-se que no sexo feminino 66.7% (8 em 12) são positivos para o BKV, 8.3% (1 em 12) são positivos em simultâneo para o BKV e para o JCV e que 25% são negativos para a presença dos poliomavírus (3 em 12). Relativamente ao sexo masculino, 54.5% são positivos para o BKV (12 em 22), 4.5% são positivos para o BKV e para o JCV e 40.9% são negativos para a presença dos poliomavírus (9 em 22) (figura 17).



**Figura 17.** Percentagem de indivíduos doentes, do sexo feminino e do sexo masculino, positivos ou negativos para a presença dos poliomavírus.

Na tabela 3 encontram-se descritos os diagnósticos, os tipos de transplante, o grau de parentesco do dador e o resultado da detecção do poliomavírus. À altura do primeiro transplante, o diagnóstico mais frequente foi a leucemia mielóide aguda (35.30%). O tipo de transplante que 79.41% dos pacientes efectuou foi o alotransplante, sendo que os irmãos são os dadores mais frequentes – 61.76% dos casos. O vírus mais frequente nos 34 doentes foi o BKV, em 58.82% dos casos, tendo sido detectado em 61.63% das amostras de urina analisadas.

No anexo II encontra-se a tabela II com os dados clínicos, o sexo, a idade, o número de transplantes que cada paciente efectuou e o intervalo de tempo (em dias) entre a amostra de urina e o transplante. Tentámos obter dados relativamente à existência de cistite hemorrágica ou de outras nefrites nestes doentes, mas não nos foi fornecida essa informação.



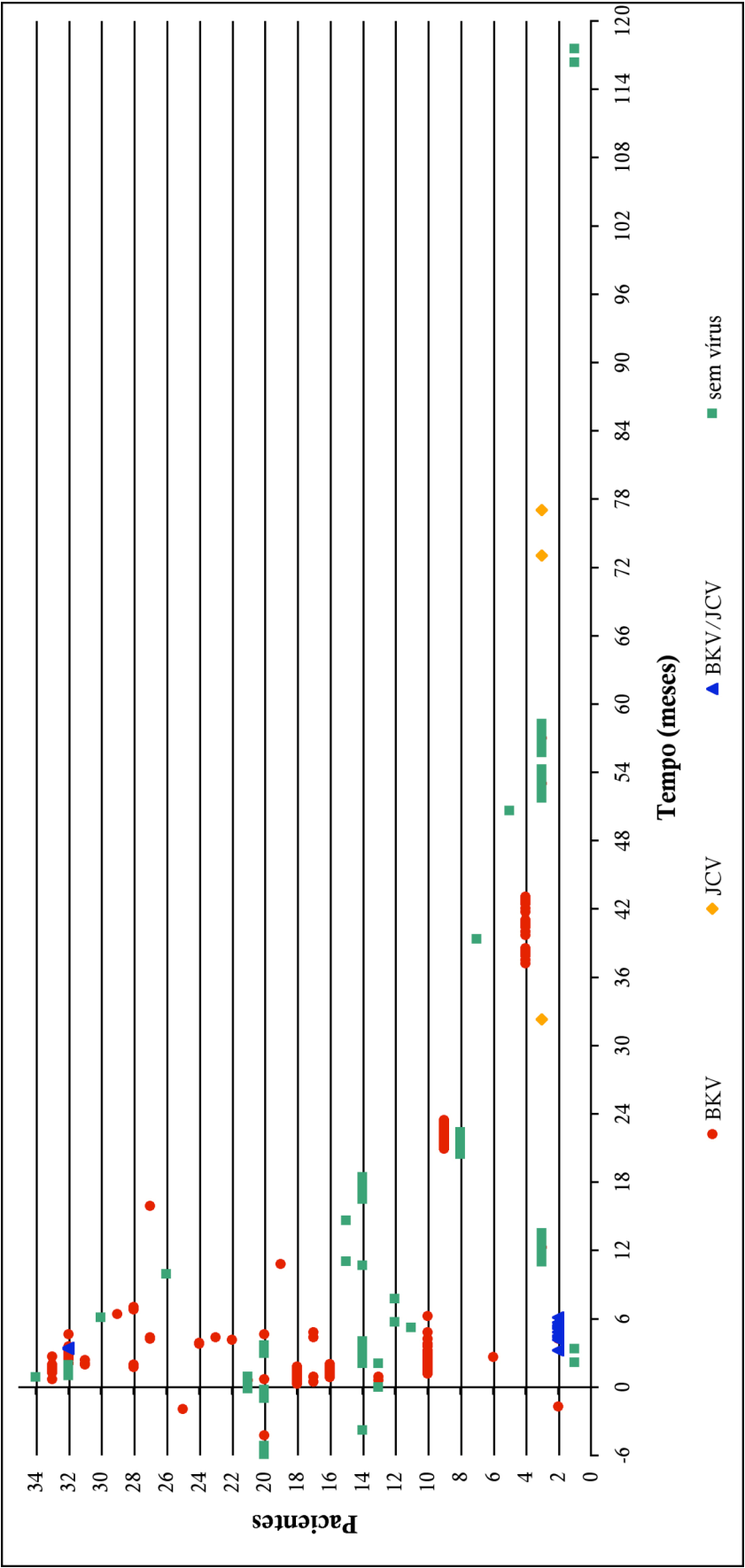
**Tabela 3.** Caracterização do grupo de doentes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas (número e frequência dos casos para o diagnóstico, para o tipo de transplante, para o parentesco e para a detecção dos vírus, relativamente ao primeiro transplante).

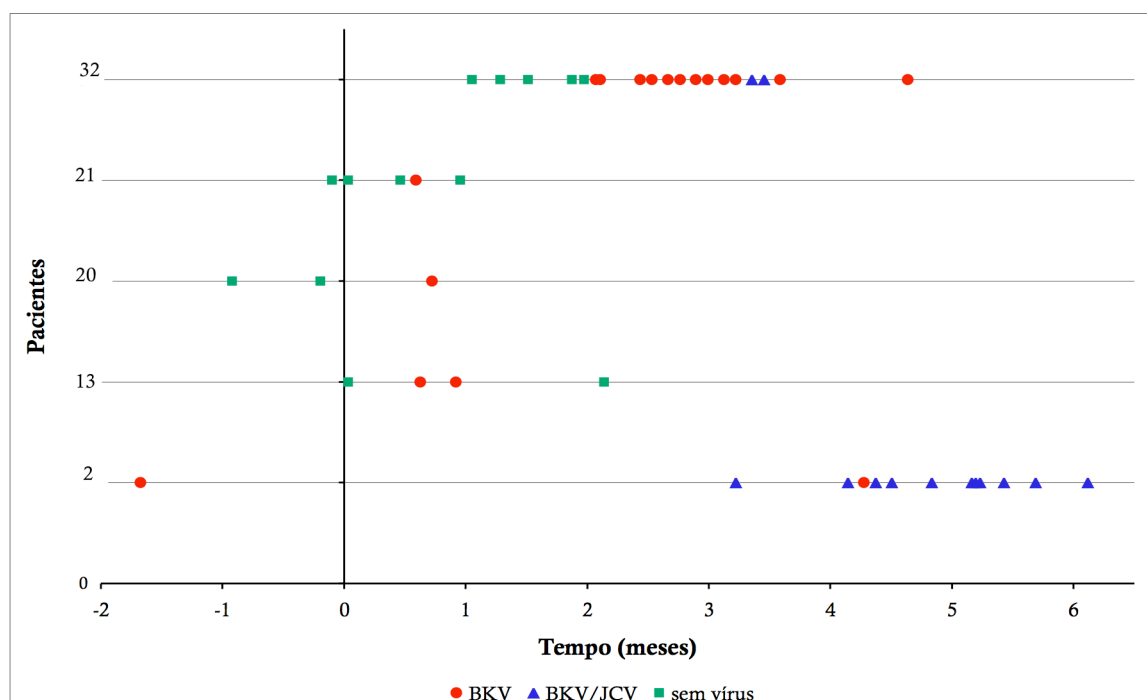
		Nº casos	Frequência (%)
<b>Diagnóstico</b> (1º Transplante)	Linfoma Hodgkin	3	8.82
	Linfoma não Hodgkin	2	5.88
	Leucemia mielóide aguda	12	35.30
	Leucemia mielóide crónica	5	14.71
	Leucemia linfóide aguda	3	8.82
	Leucemia linfóide crónica	1	2.94
	Aplasia Medular	1	2.94
	Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	1	2.94
	Metaplasia mielóide	1	2.94
	Mieloma múltiplo	5	14.71
<b>Tipo de transplante</b> (1º Transplante)	Alotransplante	27	79.41
	Autotransplante	7	20.59
<b>Grau de parentesco do dador</b> (1º Transplante)	Auto	7	20.60
	Pais	2	5.88
	Irmão	21	61.76
	Não relacionado	4	11.76
<b>Vírus</b> (por paciente)	BKV	20	58.82
	JCV	0	0.00
	BKV/JCV	2	5.88
	Sem vírus	12	35.30
<b>Vírus</b> (por amostra)	BKV	106	61.63
	JCV	1	0.58
	BKV/JCV	13	7.56
	Sem vírus	52	30.23

Na figura 18, podemos ver a distribuição temporal dos resultados para a detecção do poliomavírus, para cada um dos 34 pacientes. A grande maioria dos pacientes manteve-se constante no que se refere à presença do BKV, do BKV/JCV e à ausência dos poliomavírus. Destes 34 pacientes, 6 pacientes realizaram dois transplantes (paciente 1, paciente 8, paciente 14, paciente 15 e paciente 17) e 4 pacientes realizaram três transplantes (paciente 3, paciente 4, paciente 9 e paciente 20).

Na figura 19, está representada a distribuição temporal dos resultados para a detecção do poliomavírus em 5 pacientes, os únicos que demonstraram uma variação temporal na presença/ausência dos poliomavírus. O paciente 20 submeteu-se a três transplantes e o intervalo de tempo representado no gráfico da figura 19 refere-se ao 2º transplante, enquanto que os restantes 4 pacientes se submeteram a um só transplante. Do paciente 2 analisaram-se treze amostras, uma antes do transplante (51 dias) e as restantes amostras após o transplante. Do paciente 13 analisaram-se quatro amostras, todas após o transplante. Do paciente 20 foram analisadas duas amostras antes do transplante (6 e 28 dias) e uma amostra após o transplante. Para o paciente 21 analisaram-se cinco amostras de urina, uma correspondente a três dias antes do transplante e quatro ao período pós-transplante. Analisaram-se dezanove amostras de urina do paciente 32, todas após o transplante.

**Figura 18.** Distribuição do BKV, do BKV/JCV e da ausência dos poliomavírus, em cada paciente, ao longo dos meses.





**Figura 19.** Distribuição da presença do BKV, do BKV/JCV e da ausência dos poliovírus, em 5 pacientes ao longo dos meses.

#### Comparação entre o grupo de indivíduos saudáveis e o grupo de doentes

Comparou-se a frequência do poliovírus do grupo dos indivíduos saudáveis com a do grupo dos pacientes e verificou-se que o grupo de doentes tinha um risco acrescido de cinco vezes para a presença do poliovírus na urina em comparação com o grupo dos indivíduos saudáveis (OR=5.30; 95% IC 2.4-11.74;  $p<0.001$ ). Quando se analisaram unicamente os casos positivos para o BKV nos dois grupos, observou-se que a associação ainda era maior, com um risco aumentado de cerca de cem vezes para a presença do BKV no grupo de pacientes comparado com o grupo dos indivíduos saudáveis (OR=99.6; 95% IC 34.7-297.2;  $p<0.001$ ).

## Fase II

### Infecção, contagem das células e extracção do RNA total

Com base nas observações microscópicas, fez-se o registo da progressão da infecção (anexo III), sendo que a infecção da primeira experiência teve a duração de oito dias e a infecção da segunda experiência catorze dias. Foi extraído o RNA total das células nas diferentes fases, uma vez que o pretendido era detectar os diversos transcritos do RNAm.

O número de células presente foi calculado para um volume de 5ml e, após a extracção do RNA total, procedeu-se à medição da concentração do RNA total na amostra. Quando se calculou a concentração do RNA total por milhão de células, observou-se que a concentração mais elevada estava presente no controlo (tabela 4 e tabela 5). Ao longo da infecção da primeira experiência, a concentração do RNA total diminuiu, sendo a concentração para a amostra do frasco 2 (3º dia pós-infecção),  $0.275\mu\text{g}/10^6$  células e para a amostra do 7º dia pós-infecção,  $0.217\mu\text{g}/10^6$  células. A amostra do frasco 3 apresenta uma concentração de RNA total muito inferior à da amostra do frasco 2, apesar de corresponder, também, ao 3º dia pós-infecção.

**Tabela 4.** Número de células nos 5ml, *ratio*, concentração do RNA total, RNA total na amostra e RNA total por milhão de células, para as amostras da infecção da primeira experiência.

Amostras	Nº células em 5ml	$A_{260}/A_{280}$ ratio	Concentração do RNA total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	RNA total na amostra	RNA total ( $\mu\text{gRNA}/10^6$ células)
Controlo (células Vero)	1 437 500	1.805	0.497	49.7 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.345
Frasco 2 (3º dia pós-infecção)	600 000	1.851	0.165	16.5 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.275
Frasco 3 (3º dia pós-infecção)	3 200 000	1.830	0.231	23.1 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.072
Frasco 4 (7º dia pós-infecção)	1 000 000	1.794	0.217	21.7 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.217

Na infecção da segunda experiência, os valores da concentração do RNA total por milhão de células foram sempre inferiores a qualquer dos valores da primeira experiência. Ao longo desta infecção, a concentração de RNA total foi diminuindo, com excepção das amostras dos frascos 4 e 7, que apresentaram valores muito baixos de RNA total (tabela 5).

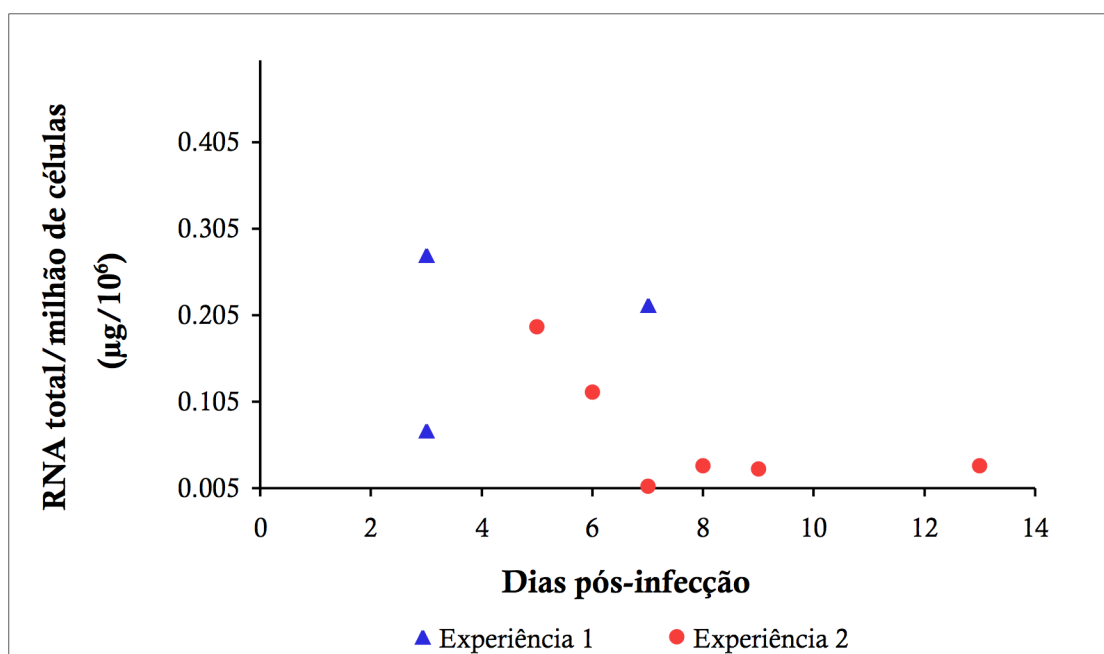
**Tabela 5.** Número de células nos 5ml, *ratio*, concentração do RNA total, RNA total na amostra e RNA total por milhão de células, para as amostras da infecção da segunda experiência.

Amostras	Nº células em 5ml	$A_{260}/A_{280}$ ratio	Concentração do RNA total ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	RNA total na amostra	RNA total ( $\mu\text{gRNA}/10^6$ células)
Controlo (células Vero)	1 437 500	1.805	0.497	49.7 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.345
Frasco 2 (5º dia pós-infecção)	600 000	1.816	0.115	11.5 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.192
Frasco 3 (6º dia pós-infecção)	3 500 000	1.809	0.408	40.8 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.116
Frasco 4 (7º dia pós-infecção)	2 812 500	1.733	0.021	2.1 $\mu\text{g}$ em 100 $\mu\text{l}$	0.007
Frasco 5 (8º dia pós-infecção)	2 450 000	1.863	0.076	3.8 $\mu\text{g}$ em 50 $\mu\text{l}$	0.031
Frasco 6 (9º dia pós-infecção)	3 212 500	1.764	0.086	4.3 $\mu\text{g}$ em 50 $\mu\text{l}$	0.027
Frasco 7 (12º dia pós-infecção)	2 637 500	0.911	0.006	0.3 $\mu\text{g}$ em 50 $\mu\text{l}$	0.002
Frasco 8 (13º dia pós-infecção)	2 900 000	1.817	0.090	4.5 $\mu\text{g}$ em 50 $\mu\text{l}$	0.031

Os valores do *ratio* encontram-se no intervalo de valores esperados (Ambion), que seriam entre 1.8 e 2.2 (tabela 4 e tabela 5), com excepção de algumas amostras da segunda experiência, nomeadamente as dos frascos 4 e 7.

Na figura 20, está representada a evolução, da concentração do RNA total em ambas as experiências. A concentração do RNA total no início da infecção viral é

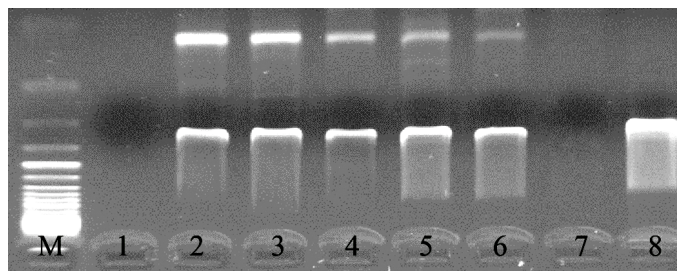
mais elevada do que no final para ambas as experiências com exceção da amostra do frasco 3.



**Figura 20.** Evolução ao longo dos dias da concentração de RNA por milhão de células, para as amostras da primeira e segunda experiências, sob a influência da infecção por BKV.

### Síntese de DNAC a partir do RNAm

A síntese do DNAC por transcrição reversa ocorreu a partir do RNAm e não do RNA total da amostra. Através da amplificação de uma região no gene da  $\beta$ -actina humana, confirmou-se a presença de DNAC e não de RNA nas amostras. O fragmento amplificado tem 353 pares de base tanto para o controlo positivo como para as amostras, embora nas amostras surja também uma banda de menor dimensão, entre 100 e 200 pares de base (figura 21). O marcador utilizado é o *GeneRuler<sup>TM</sup> 100bp DNA ladder* (Fermentas #SM0241/2/3).



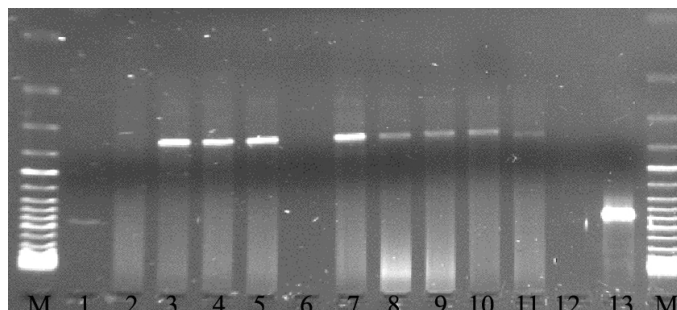
**Figura 21.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* do gene da  $\beta$ -actina (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 7 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-6 – amostras das células infectadas; 8 – controle positivo).

### Amplificação do DNAC por PCR

#### *Antigénio T grande*

Para a amostra correspondente ao DNAC das células Vero (não infectadas por BKV), não houve amplificação, tal como previsto, comprovando que houve apenas amplificação do RNAm para o antigénio T grande e para a proteína VP1.

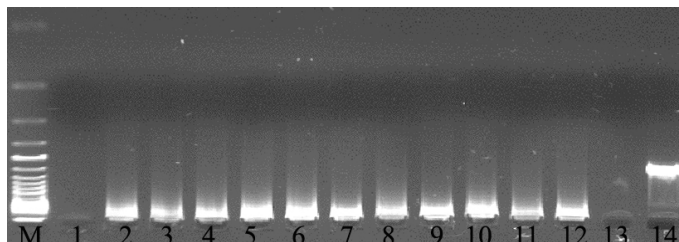
Na primeira reacção de amplificação para a região do antigénio T grande, os *primers* 307 e 308 amplificam um fragmento com 888 pares de base no controlo positivo e no caso do DNAC deveriam ter amplificado um fragmento com 543 pares de base. No entanto, o tamanho das bandas obtidas é diferente do suposto, situando-se entre os 300 e 400 pares de base (figura 22).



**Figura 22.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 307 e 308 (M – marcador molecular de 100pb; 1, 6 e 12 – controles negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-5 e 7-11 – amostras das células infectadas; 13 – controlo positivo).

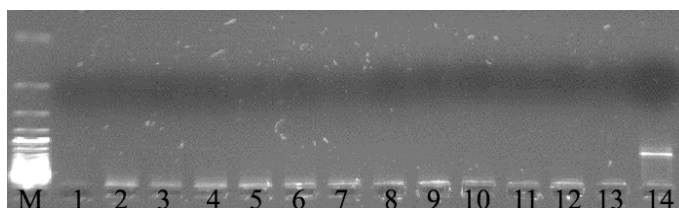


Na segunda reacção de amplificação com os *primers* 309 e 310, não se verificou amplificação da região de DNAC pretendida nas amostras, tendo apenas ocorrido no controlo positivo (figura 23).



**Figura 23.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 309 e 310 (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 13 – controlos negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-12 – amostras das células infectadas; 14 – controlo positivo).

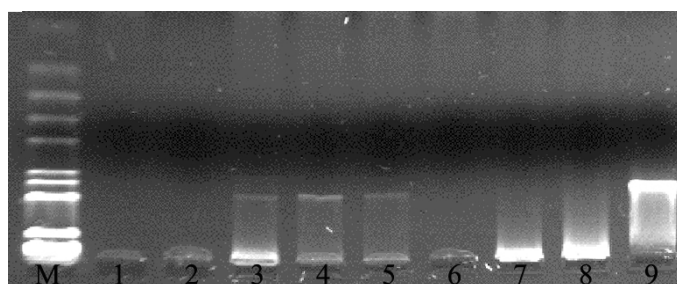
Quando se efectuou a técnica de *semi-nested* PCR com os *primers* 310 e 311, apenas o controlo positivo foi amplificado (409 pb), confirmando que realmente não existiu amplificação no PCR anterior (figura 24).



**Figura 24.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 310 e 311 (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 13 – controlos negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-12 – amostras das células infectadas; 14 – controlo positivo).

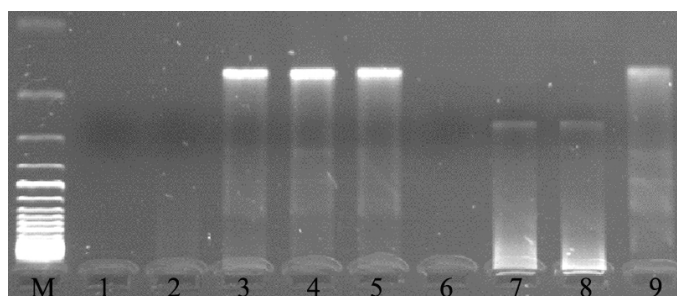
*Proteína VP1*

Na amplificação da região para a proteína VP1, os *primers* 313 e 314 originaram um fragmento com 471 pares de base tanto no controlo positivo como em algumas das amostras (figura 25).



**Figura 25.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 313 e 314 (M – marcador molecular 31 de 100pb; 1 e 6 – controlos negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-5 e 7-8 – amostras das células infectadas; 9 – controlo positivo).

Através da técnica de *semi-nested* PCR, os *primers* 249 e 314 amplificaram um fragmento com 161 pares de base quer no controlo positivo quer nas amostras positivas obtidas com os *primers* 313 e 314 (figura 26).



**Figura 26.** Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* 249 e 314 (M – marcador molecular de 100pb; 1 e 6 – controlos negativos; 2 – amostra das células Vero; 3-5 e 7-8 – amostras das células infectadas; 9 – controlo positivo).

As amostras obtidas nas duas experiências, bem como a amostra controlo, foram amplificadas utilizando todos os *primers*. Na reacção de amplificação para o gene da  $\beta$ -actina, houve amplificação para todas as amostras. As amostras de ambas as experiências amplificaram com os *primers* 307 e 308 e não amplificaram com os dois conjuntos de *primers* 309/310 e 310/311. Com os *primers* que emparelham na região codificante para a proteína VP1, verificou-se que apenas as amostras da infecção da primeira experiência amplificaram. Na tabela 6, encontram-se resumidos os resultados destas amplificações.

**Tabela 6.** Resultados das reacções de amplificação do controlo e das amostras, em ambas as infecções (– não amplificou;  $\pm$  amplificou fracamente; + amplificou).

Amostras	Antígeno T grande				Proteína VP1	
	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>	<i>Primers</i>
	$\beta$ -actina	307/308	309/310	310/311	313/314	249/314
Controlo (células Vero)	+	–	–	–	–	–
Frasco 2 (1º inf.)	+	+	–	–	$\pm$	+
Frasco 3 (1º inf.)	+	+	–	–	$\pm$	+
Frasco 4 (1º inf.)	+	+	–	–	–	+
Frasco 2 (2º inf.)	+	+	–	–	–	–
Frasco 3 (2º inf.)	+	+	–	–	–	–
Frasco 4 (2º inf.)	+	+	–	–	–	–
Frasco 5 (2º inf.)	+	+	–	–	–	–
Frasco 6 (2º inf.)	+	+	–	–	–	–
Frasco 7 (2º exp.)	+	+	–	–	–	–
Frasco 8 (2º exp.)	+	+	–	–	–	–



---

## DISCUSSÃO

Desde o ano de 1971, altura em que foram descritos pela primeira vez, os poliomavírus têm sido referidos como causadores de determinadas patologias ou como factores necessários ao seu desenvolvimento. Assim, o seu estudo ao nível do ciclo celular e da sua epidemiologia tem despertado muito interesse. No entanto, muitas questões continuam por esclarecer e, apesar da grande homologia entre o BKV e o JCV, cada um deles apresenta características muito próprias que influenciam o seu tropismo, patogenecidade e replicação viral.

O JCV é o agente causador da patologia leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) e tem suscitado ainda mais interesse a partir do momento em se verificou que esta doença é muito frequente em indivíduos com SIDA. Relativamente ao BKV, este é detectado sobretudo em doentes que se submeteram a transplantação de órgãos, geralmente transplantes renais e transplantes de células progenitoras hematopoiéticas. Enquanto que se sabe que o JCV é responsável pela patologia referida anteriormente, ainda não se conhecem totalmente as complicações associadas à presença do BKV. Nos pacientes submetidos a transplantação, a cistite hemorrágica e outras nefrites têm sido associadas à infecção ou reactivação do BKV. No entanto, outros factores também contribuem para o aparecimento destas patologias, nomeadamente as condições do hospedeiro e alguns dos tratamentos que são administrados (Azzi *et al.*, 1994).

O primeiro contacto que os humanos têm com estes vírus é, geralmente, na infância. Após infecção, o BKV e o JCV permanecem latentes no organismo e o sistema imunitário do hospedeiro desenvolve anticorpos específicos para estes vírus, e, quando necessário, aumenta os níveis de produção dos anticorpos específicos.

## Fase I

Com base nestes pressupostos, tentamos detectar e caracterizar a frequência do BKV e do JCV numa população residente no Norte de Portugal e num grupo de doentes que se submeteram a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas.

### Grupo dos indivíduos saudáveis

No grupo dos indivíduos saudáveis (dadores de sangue no IPO – Porto), a frequência do JCV nas 498 amostras de urina analisadas foi de 24% e a frequência do BKV foi de 1.8% totalizando 128 indivíduos positivos para os poliomavírus.

Os nossos resultados demonstram que a frequência do JCV na população do norte de Portugal é semelhante à frequência do JCV em algumas populações asiáticas e diferente de outras populações europeias e americanas. No caso da população do Taiwan, as grávidas têm uma frequência do JCV semelhante à nossa (Tsai *et al.*, 1997). A frequência do JCV na população italiana é diferente na frequência da nossa população, mas mesmo nas duas subpopulações italianas as frequências obtidas são diferentes (Azzi *et al.*, 1999; Pagani *et al.*, 2003), o que demonstra que provavelmente dentro da mesma população existem também algumas variações. No entanto, todos os estudos referidos apresentam um baixo número de indivíduos analisados, o que confere um poder estatístico pequeno, com a excepção do nosso estudo que já tem uma amostragem significativa da nossa população. Ultimamente a tipificação do JCV tem sido muito utilizada para avaliar a semelhança entre as populações e a origem destas (Sugimoto *et al.*, 1997; Stoner *et al.*, 2000; Yogo *et al.*, 2004). Já foram identificados três genótipos base: o tipo A, que é prevalente na Europa; o tipo B, que se propaga principalmente pela Ásia e por África, e o tipo C, que é característico da parte ocidental de África (Sugimoto *et al.*, 1997). Ao tipificarmos o JCV em todas as populações, além de analisarmos a sua frequência, determinamos qual o genótipo mais comum em cada uma delas. Por exemplo, ao sabermos qual o genótipo

característico na leucoencefalopatia multifocal progressiva, podemos tentar prever se uma determinada população apresenta um maior risco de desenvolver esta patologia ou não.

Ao analisarmos a frequência do poliomavírus de acordo com o sexo, verificamos que os indivíduos do sexo masculino apresentam uma maior percentagem de casos positivos para a presença do poliomavírus (29.5%) do que os indivíduos do sexo feminino (20.7%) (OR=1.6; 95% IC 1.05-2.44;  $p=0.026$ ). Esta tendência já foi observada por outros autores, embora em alguns estudos não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas (Agostini *et al.*, 1996; Pagani *et al.*, 2003; Jeong *et al.*, 2004).

Relativamente à idade, no nosso estudo dividimos os indivíduos por 4 subgrupos, em que verificamos que a frequência dos poliomavírus vai aumentando com o avançar da idade. A frequência dos poliomavírus no primeiro subgrupo é de 15.2% e no quarto subgrupo é de 37.7% ( $p=0.006$ ). Noutros estudos também se observou uma maior frequência do JCV em indivíduos com idades mais avançadas: numa população italiana observou-se que a frequência do JCV aumentava em indivíduos com idades superiores a 40 anos ( $p<0.001$ ) (Pagani *et al.*, 2003); numa população coreana a partir dos 40 anos a frequência do JCV também aumentava ( $p=0.007$ ) (Jeong *et al.*, 2004) e numa população americana a frequência do JCV na urina aumentava nas idades mais avançadas (apesar de esta diferença não ser estatisticamente significativa) (Agostini *et al.*, 1996).

Todos os estudos aqui referidos parecem ser concordantes relativamente ao facto de os indivíduos do sexo masculino possuírem uma maior frequência de excreção do JCV do que os indivíduos do sexo feminino e que indivíduos com idades mais avançadas têm uma maior frequência do JCV. Assumindo que a presença do JCV na urina se deve à reactivação, a maior frequência do JCV pode ser explicada com uma mais habitual, embora transitória, diminuição da imunidade do hospedeiro nesses indivíduos quando comparado com indivíduos mais novos (Pagani *et al.*, 2003).

Em suma, a frequência dos poliomavírus em indivíduos imunocompetentes é muito variável e a sua infecção não representa uma ameaça clínica para o hospedeiro (Dorries, 1998). Sendo por isso necessário que estudos como este e como outros sejam

efectuados nas várias populações a nível mundial, de forma a obter-se um perfil epidemiológico dos poliomavírus.

### Grupo dos doentes

O BKV tem sido detectado em doentes submetidos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas e descrito como um dos possíveis causadores da cistite hemorrágica (Azzi *et al.*, 1994). Assim, pretendemos com este estudo avaliar a frequência dos poliomavírus em amostras de urina desses doentes. O grupo estudado consistiu em 34 pacientes em que 58.8% dos casos foram positivos para o BKV, o que também foi descrito por outros autores (Arthur *et al.*, 1986; Markowitz *et al.*, 1991; Cotterill *et al.*, 1992; Priftakis *et al.*, 2000). Foi observada uma variação na presença/ausência do poliomavírus em apenas em 5 pacientes.

O paciente 2 foi positivo para a presença de DNA do BKV 51 dias antes do transplante e a primeira amostra analisada pós-transplante correspondeu ao 98º dia, sendo positiva simultaneamente para o BKV e para o JCV. A detecção do JCV após o transplante poderá indicar que o doente na altura do transplante foi infectado por JCV ou que a terapia de imunossupressão levou à sua reactivação, aumentando os níveis de excreção na urina para valores detectáveis. No caso dos pacientes 13, 20, 21 e 32, as amostras analisadas antes do transplante ou imediatamente após foram negativas. Quando se analisaram as amostras subsequentes, verificou-se que estas eram positivas para a presença do BKV. Provavelmente o aumento da imunossupressão desempenhou um papel na reactivação do poliomavírus. Alguns estudos indicam que, diminuindo a imunossupressão, a carga viral do BKV também é diminuída e a inflamação no enxerto é reduzida (Randhawa *et al.*, 1999; Peinemann *et al.*, 2000; Mylonakis *et al.*, 2001).

Todos os outros pacientes analisados se mantiveram constantes no que se refere à presença ou ausência dos poliomavírus. No nosso estudo, o BKV foi detectado entre a terceira e quarta semanas (paciente 3, paciente 20 e paciente 21), o que foi também observado por outros (Arthur *et al.*, 1986; Azzi *et al.*, 1994). Em



doentes transplantados, a co-infecção do BKV e do JCV não é muito frequente, embora já tenha sido descrita em pacientes submetidos a transplante renal com nefrite intersticial causada pelo BKV (Randhawa *et al.*, 2001). A leucoencefalopatia multifocal progressiva também já foi descrita em doentes que se submeteram a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas (Kwak *et al.*, 2002). Assim, a detecção do BKV e do JCV neste grupo de doentes e também na população em geral é de extrema importância.

Quando comparamos os dois grupos, verificamos que o grupo dos doentes tem um risco acrescido de cinco vezes para a presença dos poliomavírus relativamente ao grupo de indivíduos saudáveis (OR=5.3; 95% IC 2.14-11.74;  $p<0.001$ ). Na população de indivíduos saudáveis não foi encontrado nenhum indivíduo positivo para o BKV e para o JCV, em simultâneo, ao contrário do que aconteceu no grupo de doentes. Quando se analisaram unicamente os casos positivos para o BKV nos dois grupos, observou-se que a associação ainda era maior, com um risco aumentado de cerca de cem vezes para a presença do BKV no grupo dos doentes em relação ao grupo dos indivíduos saudáveis (OR=99.6; 95% IC 34.7-297.2;  $p<0.001$ ). A detecção dos poliomavírus, em particular do BKV, deve ser efectuada o mais cedo possível em doentes submetidos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas, uma vez que a sua presença é importante para um prognóstico mais correcto. Para além disso, a avaliação da progressão da infecção deve ser acompanhada ao longo do processo de transplantação, visto que a presença/ausência deste vírus é variável ao longo do tempo.

## **Fase II**

Nesta fase pretendia-se elaborar um protocolo que permita amplificar o RNA mensageiro correspondente ao antígeno T grande e à proteína VP1, de forma a que fosse possível distinguir entre uma infecção latente e uma infecção produtiva.

A infecção das células Vero pelo BKV permitiu-nos extrair o RNA total e por transcrição reversa obter o DNAc, que foi amplificado posteriormente.

### Infecção, contagem e extracção do RNA total

A maior concentração de RNA total por milhão de células corresponde à amostra do frasco que continha unicamente as células Vero. Tal poderá dever-se ao facto de as células Vero se replicarem e produzirem os seus transcritos de RNA sem a interferência do vírus BK, enquanto que todas as outras amostras foram extraídas de frascos que continham as células Vero infectadas. A presença do BKV impede a normal replicação (necessita da maquinaria celular para a replicação do seu genoma) e causa a morte celular. Assim, as células diminuem a sua capacidade de replicação, o que implica a diminuição do número de transcritos de RNA.

Através das observações microscópicas dos frascos na primeira experiência, verificou-se que as células do frasco 3 apresentavam núcleos de maiores dimensões comparativamente às do frasco 2, o que nos levou a crer que a infecção no frasco 3 estava num estado mais avançado. No entanto, a concentração do RNA total da amostra do frasco 3 –  $0.072\mu\text{g}/10^6$ , é menor do que a do frasco 2. Uma possível explicação é que as células do frasco 3 poderão ter morrido, uma vez que se observaram células a flutuar no meio de cultura, em vez da monocamada característica.

Na infecção da segunda experiência foi utilizada uma quantidade menor do vírus para que a infecção se processasse mais gradualmente, por forma a podermos obter RNAm característico de cada fase do ciclo viral. Nesta infecção a concentração do RNA total por milhão de células foi sempre inferior aos valores da primeira experiência, o que pode decorrer das próprias células Vero, uma vez que estas apresentaram alguma dificuldade no crescimento e manutenção em cultura. Entre o 5º e o 7º dia pós-infecção, o meio de cultura manteve a cor característica, o que levou a crer que as células estariam mortas. Talvez se deva a isso a baixa concentração de RNA total na amostra do frasco 4. Apenas no 9º dia pós-infecção as células apresentaram núcleos de grandes dimensões, ao contrário do que aconteceu na infecção da primeira experiência, em que se observou um aumento dos núcleos no 3º dia pós-infecção. Estas observações parecem indicar que a quantidade de vírus existente é importante para a progressão lenta ou rápida da infecção viral.

### Amplificação do DNAC por PCR

Após a obtenção do DNAC, tentou-se amplificar regiões codificantes para o antígeno T grande e para a proteína VP1. Na primeira reação de amplificação para a região do antígeno T grande utilizando os *primers* 307 e 308, era esperado a amplificação de um fragmento de 543 pares de base, visto que no DNAC a região correspondente ao intrão já foi removida (343 pb). No entanto, o tamanho das bandas obtidas foi entre os 300 e 400 pares de base. Quando se utilizaram os *primers* 309 e 310, não houve amplificação. O *primer* 309 emparelha numa sequência localizada na região amplificada pelos *primers* 307 e 308. Com base nestas observações, supomos que a sequência onde o *primer* 309 emparelha ou próximo desta terá sido removida, ou no próprio genoma ou no RNAm, podendo ter acontecido uma das duas situações:

1º – a nível do genoma terá ocorrido o *splicing* de mais uma região, para além do intrão na região codificante para o antígeno T grande; uma deleção ou integração de parte do DNA viral no genoma do hospedeiro, fazendo com que o pré-RNA mensageiro transcrito fosse mais pequeno;

2º – terá ocorrido um *splicing* alternativo diferente no pré-RNA mensageiro da região precoce, o que teria originado um transcrito de RNA mensageiro mais pequeno do que o normal.

Alguns estudos referem a existência de outros locais de *splicing* na região do genoma do BKV que codifica para o antígeno T grande (Manaker *et al.*, 1979; Seif *et al.*, 1979a; Seif *et al.*, 1979b). A integração do DNA viral no genoma do hospedeiro já foi descrita, mas só para células não permissivas, o que não é o caso das células Vero (Chenciner *et al.*, 1980). A integração acontece ao acaso quer ao nível do local do genoma celular onde se integra quer no ponto em que ocorre a recombinação viral (White and Khalili, 2004). Para confirmar esta hipótese, teria sido necessário verificar se o RNAm codificava para uma proteína funcional ou sequenciar o DNAC.

Quanto à segunda hipótese, sabe-se que a sequência dos nucleótidos no locais de *splicing* é crucial para o mecanismo de *splicing* no pré-RNAm, uma vez que existem nucleótidos preferenciais (Seif *et al.*, 1979a). Para o SV40, o mecanismo de *splicing* alternativo do pré-RNA mensageiro já foi descrito, e em estudos *in vitro* observou-se, em algumas ocasiões, a existência de fragmentos de RNAm desconhecidos (Noble *et al.*, 1986). Uma vez que este vírus apresenta algumas semelhanças com o BKV, principalmente ao nível do mecanismo de *splicing*, supomos que poderá ter ocorrido um processo de *splicing* diferente, o que teria originado o fragmento de tamanho inferior ao esperado (Manaker *et al.*, 1979).

Relativamente à amplificação da região codificante para a proteína VP1, nas amostras da segunda experiência não se detectou o RNAm para esta proteína. Isto poderá dever-se ao facto de as células terem morrido antes de haver replicação do genoma viral com subsequente não produção do RNAm codificante para a proteína VP1 (Ding *et al.*, 2002). Sem replicação do DNA viral, a fase precoce da infecção é prolongada, permitindo níveis de acumulação do RNAm precoce mais elevados (Hyde-DeRuyscher and Carmichael, 1988; 1990).

A quantidade de vírus utilizado na segunda experiência foi menor do que a utilizada na primeira experiência, o que também pode ter influenciado a replicação viral. De acordo com um estudo efectuado por Hyde-DeRuyscher e colaboradores (1990), se as células contêm poucas cópias do genoma do poliomavírus, este não é capaz de produzir quantidades detectáveis de RNA mensageiro tardio.

A optimização desta técnica para a medição do RNA mensageiro tardio é fundamental, porque vai possibilitar distinguir entre uma infecção latente e uma infecção activa. Na prática, isto pode permitir que haja um tratamento ou uma terapia anti-viral mais específica e dirigida para cada doente, evitando que sejam administradas doses de fármacos em quantidades diminutas ou excessivas, visto que estes doentes já se encontram em situações de grande imunossupressão.

---

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os poliomavírus BKV e JCV têm sido alvo de vários estudos quer ao nível da sua biologia quer ao nível da sua epidemiologia, sendo a análise da distribuição geográfica mundial dos diferentes genótipos do JCV e do BKV de interesse relevante. Para tal é necessário caracterizar a transmissão destes vírus entre indivíduos; descobrir os locais no organismo onde permanecem latentes após a infecção e o que despoleta a reactivação viral, e elaborar o perfil da frequência dos poliomavírus em cada população. Neste trabalho a distribuição do poliomavírus foi analisada numa população de indivíduos saudáveis da região Norte de Portugal e num grupo de doentes submetidos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas.

A caracterização da população de doentes que estes vírus infecta é de extrema importância, bem como a determinação das patologias que estes vírus podem originar. O JCV é o agente etiológico da leucoencefalopatia multifocal progressiva e tem sido extensivamente estudado, principalmente em indivíduos com SIDA. O BKV é associado a complicações pós-transplantação, embora a sua presença seja muito variável de paciente para paciente e de acordo com o órgão transplantado. Recentemente, estes dois vírus têm sido detectados em pacientes com cancro de cólon e colorectal (Laghi *et al.*, 1999; Ricciardiello *et al.*, 2001).

O desenvolvimento de novas técnicas, especialmente técnicas moleculares, tem contribuído para uma melhor compreensão da história natural e comportamento destes vírus ubíquos (Gardner and Knowles, 1995). O diagnóstico da infecção activa do poliomavírus é baseado na observação das células *decoy* (células com corpos de inclusão intranucleares) existentes na urina, por visualização directa, usando o microscópio electrónico, ou por métodos citológicos, pelo isolamento dos vírus e por técnicas que detectam antígenos virais ou ácidos nucleicos (Nickeleit *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001; Mylonakis *et al.*, 2001). Por outro lado, a técnica de *Polymerase Chain Reaction* tem permitido a realização de ensaios para a detecção do DNA do BKV em

plasma, soro, leucócitos do sangue periférico e em amostras de urina (Biel *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2001; Limaye *et al.*, 2001). No entanto, para distinguir entre uma infecção latente e uma infecção produtiva, a medição dos níveis do RNAm para a proteína VP1 do BKV pode ser importante para a caracterização da história natural da infecção do BKV e para a melhoria de estratégias terapêuticas antivirais (Ding *et al.*, 2002). Neste trabalho foi iniciada a elaboração de um protocolo que permita a medição do RNA mensageiro nas amostras de urina dos doentes.

Por outro lado, o conhecimento do comportamento biológico e do ciclo de vida destes patogéneos humanos permite a identificação de novas terapias para combater as infecções por BKV e por JCV, uma vez que actualmente não existe tratamento específico para estes vírus.

No futuro, pretendemos otimizar o protocolo para a medição do RNAm para a proteína VP1 do BKV e do JCV nos doentes, distinguindo assim uma infecção latente de uma infecção activa; quantificar a carga viral nas amostras de urina dos indivíduos saudáveis e dos doentes recorrendo à técnica do *Real-Time-Polymerase Chain Reaction*; identificar os diversos tipos do JCV existentes na nossa população, e aumentar a amostragem de ambos os grupos.

Concluindo, pretendemos completar o perfil dos poliomavírus na população de indivíduos saudáveis da região Norte e provavelmente de outras regiões de Portugal, bem como caracterizar mais detalhadamente, a nível clínico, o grupo de doentes submetidos a transplantação de células progenitoras hematopoiéticas.

---

## BIBLIOGRAFIA

**Agostini, H.T., Ryschkewitsch, C.F. and Stoner, G.L.** (1996). Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 34:159-164.

**Arthur, R.R., Shah, K.V., Baust, S.J., Santos, G.W. and Saral, R.** (1986). Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N Engl J Med* 315:230-234.

**Arthur, R.R., Dagostin, S. and Shah, K.V.** (1989). Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:1174-1179.

**Atwood, W.J.** (2001). "Cellular Receptors for the Polyomaviruses". In Khalili, K. and Stoner, G.S. (ed.), *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspective*. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 179-196.

**Ault, G.S. and Stoner, G.L.** (1993). Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure. *J Gen Virol* 74 (Pt 8):1499-1507.

**Azzi, A., Fanci, R., Bosi, A., Ciappi, S., Zakrzewska, K., de Santis, R., Laszlo, D., Guidi, S., Saccardi, R., Vannucchi, A.M. and et al.** (1994). Monitoring of polyomavirus BK viruria in bone marrow transplantation patients by DNA hybridization assay and by polymerase chain reaction: an approach to assess the relationship between BK viruria and hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant* 14:235-240.

**Azzi, A., Cesaro, S., Laszlo, D., Zakrzewska, K., Ciappi, S., De Santis, R., Fanci, R., Pesavento, G., Calore, E. and Bosi, A.** (1999). Human polyomavirus BK (BKV) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients. *J Clin Virol* 14:79-86.

**Barouch, D.H. and Harrison, S.C.** (1994). Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol* 68:3982-3989.

**Bendiksen, S., Rekvig, O.P., Van Ghelue, M. and Moens, U.** (2000). VP1 DNA sequences of JC and BK viruses detected in urine of systemic lupus erythematosus patients reveal no differences from strains expressed in normal individuals. *J Gen Virol* 81:2625-2633.

**Betticher, D.C., Thatcher, N., Altermatt, H.J., Hoban, P., Ryder, W.D. and Heighway, J.** (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 11:1005-1011.

**Biel, S.S., Held, T.K., Landt, O., Niedrig, M., Gelderblom, H.R., Siegert, W. and Nitsche, A.** (2000). Rapid quantification and differentiation of human polyomavirus DNA in undiluted urine from patients after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol* 38:3689-3695.

**Binet, I., Nicleleit, V., Hirsch, H.H., Prince, O., Dalquen, P., Gudat, F., Mihatsch, M.J. and Thiel, G.** (1999). Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 67:918-922.

**Breau, W.C., Atwood, W.J. and Norkin, L.C.** (1992). Class I major histocompatibility proteins are an essential component of the simian virus 40 receptor. *J Virol* 66:2037-2045.

**Carswell, S. and Alwine, J.C.** (1986). Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J Virol* 60:1055-1061.

**Chang, D., Haynes, J.I., 2nd, Brady, J.N. and Consigli, R.A.** (1992). Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 191:978-983.



**Chenciner, N., Meneguzzi, G., Corallini, A., Grossi, M.P., Grassi, P., Barbanti-Brodano, G. and Milanesi, G.** (1980). Integrated and free viral DNA in hamster tumors induced by BK virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:975-979.

**Chesters, P.M., Heritage, J. and McCance, D.J.** (1983). Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147:676-684.

**Cole, C.N. and Conzen, S.D.** (2001). "Polyomaviridae: The viruses and their replication". In Knipe, D.M. and Howley, P.M. (ed.), *Field's Virology*, vol. 2. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 21-41.

**Coleman, D.V., Wolfendale, M.R., Daniel, R.A., Dhanjal, N.K., Gardner, S.D., Gibson, P.E. and Field, A.M.** (1980). A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis* 142:1-8.

**Cotterill, H.A., Macaulay, M.E. and Wong, V.** (1992). Reactivation of polyomavirus in bone marrow transplant recipients. *J Clin Pathol* 45:445.

**Daniel, A.M., Swenson, J.J., Mayreddy, R.P., Khalili, K. and Frisque, R.J.** (1996). Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. *Virology* 216:90-101.

**Darbinyan, A., Darbinian, N., Safak, M., Radhakrishnan, S., Giordano, A. and Khalili, K.** (2002). Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. *Oncogene* 21:5574-5581.

**Darbinyan, A., Siddiqui, K.M., Slonina, D., Darbinian, N., Amini, S., White, M.K. and Khalili, K.** (2004). Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. *J Virol* 78:8593-8600.

**DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M.** (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54:275-283.

**DiMaio, D. and Nathans, D.** (1982). Regulatory mutants of simian virus 40. Effect of mutations at a T antigen binding site on DNA replication and expression of viral genes. *J Mol Biol* 156:531-548.

**Ding, R., Medeiros, M., Dadhania, D., Muthukumar, T., Kracker, D., Kong, J.M., Epstein, S.R., Sharma, V.K., Seshan, S.V., Li, B. and Suthanthiran, M.** (2002). Noninvasive diagnosis of BK virus nephritis by measurement of messenger RNA for BK virus VP1 in urine. *Transplantation* 74:987-994.

**Dornreiter, I., Erdile, L.F., Gilbert, I.U., von Winkler, D., Kelly, T.J. and Fanning, E.** (1992). Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen. *Embo J* 11:769-776.

**Dorries, K., Vogel, E., Gunther, S. and Czub, S.** (1994). Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198:59-70.

**Dorries, K.** (1996). Virus-host interactions and diagnosis of human polyomavirus-associated disease. *Intervirology* 39:165-175.

**Dorries, K.** (1998). Molecular biology and pathogenesis of human polyomavirus infections. *Dev Biol Stand* 94:71-79.

**Eash, S., Manley, K., Gasparovic, M., Querbes, W. and Atwood, W.J.** (2006). The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci* 63(7-8):865-876.

**Elphick, G.F., Querbes, W., Jordan, J.A., Gee, G.V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W.K., Roth, B.L. and Atwood, W.J.** (2004). The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306:1380-1383.

**Ferguson, A.T. and Subramani, S.** (1994). Complex functional interactions at the early enhancer of the PQ strain of BK virus. *J Virol* 68:4274-4286.

**Ferrante, P., Caldarelli-Stefano, R., Omodeo-Zorini, E., Vago, L., Boldorini, R. and Costanzi, G.** (1995). PCR detection of JC virus DNA in brain tissue from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol* 47:219-225.

**Fishman, J.A.** (2002). BK virus nephropathy-polyomavirus adding insult to injury. *N Engl J Med* 347:527-530.

**Flaegstad, T., Traavik, T. and Kristiansen, B.E.** (1986). Age-dependent prevalence of BK virus IgG and IgM antibodies measured by enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). *J Hyg (Lond)* 96:523-528.

**Frisque, R.J., Bream, G.L. and Cannella, M.T.** (1984). Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51:458-469.

**Frisque, R.J.** (1999). "JC and BK viruses (Papovaviridae)". In Granoff, A.G. and Webster, R.G. (ed.), *Encyclopedia of Virology*, vol. 2. Academic Press, p. 876-883.

**Gallia, G.L., Houff, S.A., Major, E.O. and Khalili, K.** (1997). Review: JC virus infection of lymphocytes-revisited. *J Infect Dis* 176:1603-1609.

**Gardner, S.D., Field, A.M., Coleman, D.V. and Hulme, B.** (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1:1253-1257.

**Gardner, S.D. and Knowles, W.A.** (1995). "Human Polyomaviruses" *Principles and Practical Clinical Virology*, 3<sup>a</sup> Ed. ed, p. 635-651.

**Geraldes, A.** (2002). "Papovavírus". In Ferreira, W.F.C. and Sousa, J.C.F. (ed.), *Microbiologia*, vol. 3. Lidel, Porto, p. 63-72.

**Good, P.J., Welch, R.C., Ryu, W.S. and Mertz, J.E.** (1988). The late spliced 19S and 16S RNAs of simian virus 40 can be synthesized from a common pool of transcripts. *J Virol* 62:563-571.

**Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., van Strien, A. and van der Noordaa, J.** (1982). The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* 10:91-99.

**Hurley, R.A., Ernst, T., Khalili, K., Del Valle, L., Simone, I.L. and Taber, K.H.** (2003). Identification of HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: magnetic resonance imaging and spectroscopy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 15:1-6.

**Hyde-DeRuyscher, R. and Carmichael, G.G.** (1988). Polyomavirus early-late switch is not regulated at the level of transcription initiation and is associated with changes in RNA processing. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:8993-8997.

**Hyde-DeRuyscher, R.P. and Carmichael, G.G.** (1990). Polyomavirus late pre-mRNA processing: DNA replication-associated changes in leader exon multiplicity suggest a role for leader-to-leader splicing in the early-late switch. *J Virol* 64:5823-5832.

**Imperiale, M.J.** (2001). "The Human Polyomaviruses: an overview". In Khalili, K. and Stoner, G.L. (ed.), *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspective*. Wiley-Liss, New York, p. 53-71.

**Jeong, B.H., Lee, K.H., Choi, E.K., Kim, K. and Kim, Y.S.** (2004). Genotyping of the JC virus in urine samples of healthy Korean individuals. *J Med Virol* 72:281-289.

**Johnsen, J.I., Seternes, O.M., Johansen, T., Moens, U., Mantjarvi, R. and Traavik, T.** (1995). Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: sequence comparisons and biological characteristics. *J Gen Virol* 76 ( Pt 7):1571-1581.

**Kim, H.-S., Henson, J.W. and Frisque, R.J.** (2001). "Transcription and Replication in the Human Polyomaviruses". *In* Kamel, K. and Stoner, G.L. (ed.), *Human Polyomaviruses - Molecular and Clinical perspectives*. Wiley-Liss, New York, p. 73-105.

**Kitamura, T., Aso, Y., Kuniyoshi, N., Hara, K. and Yogo, Y.** (1990). High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J Infect Dis* 161:1128-1133.

**Kwak, E.J., Vilchez, R.A., Randhawa, P., Shapiro, R., Butel, J.S. and Kusne, S.** (2002). Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 35:1081-1087.

**Laghi, L., Randolph, A.E., Chauhan, D.P., Marra, G., Major, E.O., Neel, J.V. and Boland, C.R.** (1999). JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci* 96:7484-7489.

**Laghi, L., Randolph, A.E., Malesci, A. and Boland, C.R.** (2004). Constraints imposed by supercoiling on in vitro amplification of polyomavirus DNA. *J Gen Virol* 85:3383-3388.

**Leung, A.Y., Suen, C.K., Lie, A.K., Liang, R.H., Yuen, K.Y. and Kwong, Y.L.** (2001). Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood* 98:1971-1978.

**Limaye, A.P., Jerome, K.R., Kuhr, C.S., Ferrenberg, J., Huang, M.L., Davis, C.L., Corey, L. and Marsh, C.L.** (2001). Quantitation of BK virus load in serum for the

diagnosis of BK virus-associated nephropathy in renal transplant recipients. *J Infect Dis* 183:1669-1672.

**Lin, P.L., Vats, A.N. and Green, M.** (2001). BK virus infection in renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 5:398-405.

**Louie, A.J.** (1975). The organization of proteins in polyoma and cellular chromatin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 39 Pt 1:259-266.

**Low, J.A., Magnuson, B., Tsai, B. and Imperiale, M.J.** (2006). Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol* 80:1361-1366.

**Manaker, R.A., Khoury, G. and Lai, C.J.** (1979). The spliced structure of BK virus mRNAs in lytically infected and transformed cells. *Virology* 97:112-121.

**Markowitz, R.B., Eaton, B.A., Kubik, M.F., Latorra, D., McGregor, J.A. and Dynan, W.S.** (1991). BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 65:4515-4519.

**Markowitz, R.B., Thompson, H.C., Mueller, J.F., Cohen, J.A. and Dynan, W.S.** (1993). Incidence of BK virus and JC virus viruria in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected subjects. *J Infect Dis* 167:13-20.

**Moens, U. and Rekvig, O.P.** (2001). "Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection". In Khalili, K. and Stoner, G.L. (ed.), *Human Polyomaviruses - Molecular and Clinical perspectives*. Wiley-Liss, New York, p. 359-408.

**Monini, P., Rotola, A., de Lellis, L., Corallini, A., Secchiero, P., Albini, A., Benelli, R., Parravicini, C., Barbanti-Brodano, G. and Cassai, E.** (1996). Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer* 66:717-722.

**Mylonakis, E., Goes, N., Rubin, R.H., Cosimi, A.B., Colvin, R.B. and Fishman, J.A.** (2001). BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. *Transplantation* 72:1587-1592.

**Nesper, J., Smith, R.W., Kautz, A.R., Sock, E., Wegner, M., Grummt, F. and Nasheuer, H.P.** (1997). A cell-free replication system for human polyomavirus JC DNA. *J Virol* 71:7421-7428.

**Newman, J.T. and Frisque, R.J.** (1997). Detection of archetype and rearranged variants of JC virus in multiple tissues from a pediatric PML patient. *J Med Virol* 52:243-252.

**Nickeleit, V., Hirsch, H.H., Binet, I.F., Gudat, F., Prince, O., Dalquen, P., Thiel, G. and Mihatsch, M.J.** (1999). Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol* 10:1080-1089.

**Nickeleit, V., Klimkait, T., Binet, I.F., Dalquen, P., Del Zenero, V., Thiel, G., Mihatsch, M.J. and Hirsch, H.H.** (2000). Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy. *N Engl J Med* 342:1309-1315.

**Noble, J.C., Prives, C. and Manley, J.L.** (1986). In vitro splicing of simian virus 40 early pre mRNA. *Nucleic Acids Res* 14:1219-1235.

**Okada, Y., Endo, S., Takahashi, H., Sawa, H., Umemura, T. and Nagashima, K.** (2001). Distribution and function of JCV agnoprotein. *J Neurovirol* 7:302-306.

**Padgett, B.L., Walker, D.L., ZuRhein, G.M., Eckroade, R.J. and Dessel, B.H.** (1971). Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet* 1:1257-1260.

**Padgett, B.L. and Walker, D.L.** (1976). New human papovaviruses. *Prog Med Virol* 22:1-35.

**Pagani, E., Delbue, S., Mancuso, R., Borghi, E., Tarantini, L. and Ferrante, P.** (2003). Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population. *J Neurovirol* 9:559-566.

**Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L. and Roberts, T.M.** (1990). Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60:167-176.

**Peinemann, F., de Villiers, E.M., Dorries, K., Adams, O., Vogeli, T.A. and Burdach, S.** (2000). Clinical course and treatment of haemorrhagic cystitis associated with BK type of human polyomavirus in nine paediatric recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Eur J Pediatr* 159:182-188.

**Pho, M.T., Ashok, A. and Atwood, W.J.** (2000). JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 74:2288-2292.

**Pietropaolo, V., Di Taranto, C., Degener, A.M., Jin, L., Sinibaldi, L., Baiocchi, A., Melis, M. and Orsi, N.** (1998). Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol* 56:372-376.

**Priftakis, P., Bogdanovic, G., Tyden, G. and Dalianis, T.** (2000). Polyomaviruria in renal transplant patients is not correlated to the cold ischemia period or to rejection episodes. *J Clin Microbiol* 38:406-407.

**Prins, C. and Frisque, R.J.** (2001). JC virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells. *J Neurovirol* 7:250-264.

**Randhawa, P., Baksh, F., Aoki, N., Tschirhart, D. and Finkelstein, S.** (2001). JC virus infection in allograft kidneys: analysis by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Transplantation* 71:1300-1303.



**Randhawa, P., Ho, A., Shapiro, R., Vats, A., Swalsky, P., Finkelstein, S., Uhrmacher, J. and Weck, K.** (2004). Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol* 42:1176-1180.

**Randhawa, P.S., Finkelstein, S., Scantlebury, V., Shapiro, R., Vivas, C., Jordan, M., Picken, M.M. and Demetris, A.J.** (1999). Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 67:103-109.

**Resnick, J. and Shenk, T.** (1986). Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus. *J Virol* 60:1098-1106.

**Ricciardiello, L., Laghi, L., Ramamirtham, P., Chang, C.L., Chang, D.K., Randolph, A.E. and Boland, C.R.** (2000). JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 119:1228-1235.

**Ricciardiello, L., Chang, D.K., Laghi, L., Goel, A., Chang, C.L. and Boland, C.R.** (2001). Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol* 75:1996-2001.

**Rinaldo, C.H., Traavik, T. and Hey, A.** (1998). The agnogene of the human polyomavirus BK is expressed. *J Virol* 72:6233-6236.

**Safak, M., Barrucco, R., Darbinyan, A., Okada, Y., Nagashima, K. and Khalili, K.** (2001). Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol* 75:1476-1486.

**Schneider, E.M. and Dorries, K.** (1993). High frequency of polyomavirus infection in lymphoid cell preparations after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplant Proc* 25:1271-1273.

**Seganti, L., Mastromarino, P., Superti, F., Sinibaldi, L. and Orsi, N.** (1981). Receptors for BK virus on human erythrocytes. *Acta Virol* 25:177-181.

**Seif, I., Khoury, G. and Dhar, R.** (1979a). BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 6:3387-3398.

**Seif, I., Khoury, G. and Dhar, R.** (1979b). The genome of human papovavirus BKV. *Cell* 18:963-977.

**Sencer, S.F., Haake, R.J. and Weisdorf, D.J.** (1993). Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. Risk factors and complications. *Transplantation* 56:875-879.

**Seth, P., Diaz, F. and Major, E.O.** (2003). Advances in the biology of JC virus and induction of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 9:236-246.

**Shah, K.V., Daniel, R.W. and Warszawski, R.M.** (1973). High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. *J Infect Dis* 128:784-787.

**Shishido-Hara, Y., Hara, Y., Larson, T., Yasui, K., Nagashima, K. and Stoner, G.L.** (2000). Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol* 74:1840-1853.

**Shishido-Hara, Y. and Nagashima, K.** (2001). "Synthesis and assembly of Polyomavirus virions". In Khalili, K. and Stoner, G.L. (ed.), *Human Polyomaviruses - Molecular and Clinical perspectives*. Wiley-Liss, New York, p. 149-177.

**Sinibaldi, L., Goldoni, P., Pietropaolo, V., Longhi, C. and Orsi, N.** (1990). Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Arch Virol* 113:291-296.

**Srivatsan, E.S., Deininger, P.L. and Friedmann, T.** (1981). Nucleotide sequence at polyoma VP1 mRNA splice sites. *J Virol* 37:244-247.

**Stahl, H., Droge, P. and Knippers, R.** (1986). DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. *Embo J* 5:1939-1944.

**Staib, C., Pesch, J., Gerwig, R., Gerber, J.K., Brehm, U., Stangl, A. and Grummt, F.** (1996). p53 inhibits JC virus DNA replication in vivo and interacts with JC virus large T-antigen. *Virology* 219:237-246.

**Stoner, G.L., Jobes, D.V., Fernandez Cobo, M., Agostini, H.T., Chima, S.C. and Ryschkewitsch, C.F.** (2000). JC virus as a marker of human migration to the Americas. *Microbes Infect* 2:1905-1911.

**Sugimoto, C., Hara, K., Taguchi, F. and Yogo, Y.** (1990). Regulatory DNA sequence conserved in the course of BK virus evolution. *J Mol Evol* 31:485-492.

**Sugimoto, C., Kitamura, T., Guo, J., Al-Ahdal, M.N., Shchelkunov, S.N., Otova, B., Ondrejka, P., Chollet, J.Y., El-Safi, S., Ettayebi, M., Gresenguet, G., Kocagoz, T., Chaiyarasamee, S., Thant, K.Z., Thein, S., Moe, K., Kobayashi, N., Taguchi, F. and Yogo, Y.** (1997). Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9191-9196.

**Sundsfjord, A., Flaegstad, T., Flo, R., Spein, A.R., Pedersen, M., Permin, H., Julsrud, J. and Traavik, T.** (1994). BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *J Infect Dis* 169:485-490.

**Tjian, R. and Robbins, A.** (1979). Enzymatic activities associated with a purified simian virus 40 T antigen-related protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:610-614.

**Tominaga, T., Yogo, Y., Kitamura, T. and Aso, Y.** (1992). Persistence of archetypal JC virus DNA in normal renal tissue derived from tumor-bearing patients. *Virology* 186:736-741.

**Trowbridge, P.W. and Frisque, R.J.** (1995). Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J Neurovirol* 1:195-206.

**Tsai, B., Gilbert, J.M., Stehle, T., Lencer, W., Benjamin, T.L. and Rapoport, T.A.** (2003). Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *Embo J* 22:4346-4355.

**Tsai, R.T., Wang, M., Ou, W.C., Lee, Y.L., Li, S.Y., Fung, C.Y., Huang, Y.L., Tzeng, T.Y., Chen, Y. and Chang, D.** (1997). Incidence of JC viruria is higher than that of BK viruria in Taiwan. *J Med Virol* 52:253-257.

**Vendrely, A., Bienvenu, B., Gasnault, J., Thiebault, J.B., Salmon, D. and Gray, F.** (2005). Fulminant inflammatory leukoencephalopathy associated with HAART-induced immune restoration in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 109:449-455.

**Volter, C., Hausen, H., Alber, D. and de Villiers, E.M.** (1997). Screening human tumor samples with a broad-spectrum polymerase chain reaction method for the detection of polyomaviruses. *Virology* 237:389-396.

**Walker, D.L. and Padgett, B.L.** (1983). The epidemiology of human polyomaviruses. *Prog Clin Biol Res* 105:99-106.

**Wei, G., Liu, C.K. and Atwood, W.J.** (2000). JC virus binds to primary human glial cells, tonsillar stromal cells, and B-lymphocytes, but not to T lymphocytes. *J Neurovirol* 6:127-136.

**White, M.K. and Khalili, K.** (2004). Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology* 324:1-16.

**Wyen, C., Hoffmann, C., Schmeisser, N., Wohrmann, A., Qurishi, N., Rockstroh, J., Esser, S., Rieke, A., Ross, B., Lorenzen, T., Schmitz, K., Stenzel, W., Salzberger, B. and Fatkenheuer, G.** (2004). Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on highly active antiretroviral therapy: survival and risk factors of death. *J Acquir Immune Defic Syndr* 37:1263-1268.

**Yang, C.C., Hurd, D.D., Case, L.D. and Assimos, D.G.** (1994). Hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *Urology* 44:322-328.

**Yang, R.C. and Wu, R.** (1979). BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. *Science* 206:456-462.

**Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, K. and Taguchi, F.** (1990). Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* 64:3139-3143.

**Yogo, Y., Sugimoto, C., Zheng, H.Y., Ikegaya, H., Takasaka, T. and Kitamura, T.** (2004). JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations. *Rev Med Virol* 14:179-191.



**Anexo I**ATV (10 litros)

NaCl	80g
KCl	4g
D (+) Glucose	10g
NaHCO <sub>3</sub>	5.8g
Trypsine (Difco250)	5g
EDTA (Na salt)	2g

## Anexo II

Tabela II. Sexo e idade na altura do transplante, e dados clínicos para cada um dos 34 pacientes.

Paciente	Sexo	Nº transplantes	Idade	Diagnóstico	Tipo de transplante	Grau do dador	HLA	Intervalo entre as datas do transplante e de colheita para cada amostra (dias)	Virus
1	M	1	41	Linfoma não Hodgkin	autotransplante	—	—	3540/3577 67/104	ausente
		2	50						
2	F	1	52	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	-51/98/126/130/133/137/147/157/158/159/165/173/186	BKV/ BKV e JCV
		1	48						
3	M	2	48	Mieloma múltiplo	autotransplante	—	—	1696/1702/1708/1713/1723/1727/1730/1734/1739/1748/1773/2343 1575/1581/1587/1592/1602/1606/1609/1613/1618/1627/1652/2222 336/342/348/353/363/367/370/374/379/388/413/983	ausente
		3	52						
		3	52						
4	M	1	37	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1270/1280/1291/1294/1298/1305/1311 1208/1218/1229/1232/1236/1243/1249 1132/1142/1153/1156/1160/1167/1173	BKV
		2	37						
		3	38						
5	F	1	54	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1541	ausente
		1	22						
6	M	1	22	Leucemia mielóide crônica	autotransplante	não relacionado	1	718	BKV
		2	23						
7	M	1	36	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1198	ausente
		1	36						
8	F	1	44	Mieloma múltiplo	autotransplante	—	—	663/673/683 623/633/643	ausente
		2	44						
9	M	1	6	Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	alotransplante	não relacionado	1	693/701/704/708/713/714 666/674/677/681/686/687 637/645/648/652/657/658	BKV
		2							
		3							
10	F	1	24	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	pais	2	36/42/49/53/56/60/67/70/74/77/81/84/88/91/95/98/109/116/130/147/190	BKV
		1	24						
11	M	1	40	Linfoma não Hodgkin	alotransplante	irmão	1	160	ausente
		1	40						
12	M	1	65	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	175/237	ausente
		1	65						
13	F	1	48	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1/19/28/65	ausente/ BKV
		1	48						
14	M	1	35	Linfoma de Hodgkin	autotransplante	—	—	326/503/510/514/517/521/534/535/549/552/556/559/ 563 -113/64/71/75/78/82/95/96/110/113/117/120/124	ausente
		2	36						
		2	36						



Tabela II. (continuação)

Paciente	Sexo	Nº transplantes	Idade	Diagnóstico	Tipo de transplante	Grau do dador	HLA	Intervalo entre as datas do transplante e de colheita para cada amostra (dias)	Vírus
15	F	1 2	21 22	Linfoma de Hodgkin	autotransplante alotransplante	— irmão	— 1	447 337	ausente ausente
16	M	1	39	Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	27/31/34/41/45/48/52/55/56/59/62	BKV
17	F	1 2	55	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	134/147 15/28	BKV
18	M	1	38	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	não relacionado	1	9/13/20/21/27/30/34/37/41/48/51/55	BKV
19	M	1	2	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	pais	2	329	BKV
20	F	1 2 3	33 33 34	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	91/113/141 -28/-6/22 -178/-156/-128	ausente/BKV
21	M	1	47	Mieloma Múltiplo	alotransplante	irmão	1	-3/1/14/18/29	ausente/BKV
22	M	1	31	Leucemia linfóide crônica	alotransplante	irmão	1	126	BKV
23	M	1	42	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	133	BKV
24	M	1	31	Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	116/119	BKV
25	F	1	20	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	-58	BKV
26	M	1	59	Mieloma múltiplo	autotransplante	—	—	303	ausente
27	F	1	37	Linfoma de Hodgkin	alotransplante	irmão	1	129/133	BKV
28	M	1	18	Aplasia Medular	alotransplante	não relacionado	1	54/61/208/215	BKV
29	M	1	23	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	196	BKV
30	M	1	49	Metaplasia mielóide	alotransplante	irmão	1	187	ausente
31	M	1	10	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	não relacionado	2	60/63/73	BKV
32	F	1	51	Mieloma múltiplo	alotransplante	irmão	1	32/39/46/57/60/63/64/74/77/81/84/88/91/95/98/102/105/109/141	ausente/BKV/ BKV e JCV
33	F	1	54	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	21/39/46/53/56/60/82	BKV
34	M	1	30	Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	28	ausente

### Anexo III

#### Registo das infecções das duas experiências

##### *Primeira experiência*

23.10.05 – Em contraste com o controlo, as células infectadas possuem núcleos grandes, mas têm os “oval eyes”.

24.10.05 – A infecção desenvolveu-se muito rapidamente; foi usada demasiada concentração de vírus; a infecção atingiu todas as monocamadas; não há “ilhas” de infecção e existem algumas células a flutuar no meio.

As células dos frascos 1 e 5 não foram extraídas.

**Tabela I.** Registo da progressão da infecção na primeira experiência.

Amostras	3º dia infecção (24.10)	4º dia infecção (25.10)	5º dia infecção (26.10)	6º dia infecção (27.10)	7º dia infecção (28.10)
Controlo	OK	OK	OK	OK	OK (com grânulos)
Frasco 1	++	++/+++	+++	+++ /++++	++++
Frasco 2	++ (extracção)	-----	-----	-----	-----
Frasco 3	++/+++ (extracção)	-----	-----	-----	-----
Frasco 4	++/+++	+++	+++ /++++	++++	++++ (extracção)
Frasco 5	++	+++ /++++	+++ /++++	++++	++++

##### *Segunda experiência*

Entre 30.11 – 04.12, as células infectadas são semelhantes às células do frasco controlo.

Desde 6 ou 7 de Dezembro o meio manteve-se cor-de-rosa.

Desde 9 de Dezembro que as células infectadas se assemelham às células do controlo, com a excepção de que as células infectadas apresentam núcleos maiores (“bigger bolls”).

Depois de 12 de Dezembro o meio ficou cor-de-laranja.

**Tabela II.** Registo da progressão da infecção na segunda experiência.

Amostras	5º dia infecção (05.12)	6º dia infecção (06.12)	7º dia infecção (07.12)	8º dia infecção (08.12)	9º dia infecção (09.12)	10º dia infecção (12.12)	11º dia infecção (13.12)
Controlo	OK	OK	*	1	1	1	1
Frasco 2	+ (extracção)	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Frasco 3	+	+ / ++ (extracção)	-----	-----	-----	-----	-----
Frasco 4	+	+ / ++	++ (extracção)*	-----	-----	-----	-----
Frasco 5	+	+ / ++	++	++ / +++ (extracção)*	-----	-----	-----
Frasco 6	+	+ / ++	++	++ / +++	++ / +++ (extracção)*	-----	-----
Frasco 7	+ / ++	+ / ++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	++ / +++ (extracção)*	-----
Frasco 8	+	+ / ++	++	++ / +++	++ / +++	++ / +++	++ / +++ (extracção)*

\* Algumas células a flutuar

<sup>1</sup> As células pareciam estar a morrer

---

## **Anexos**

### **Anexo I**

#### ATV (10 litros)

<b>NaCl</b>	<b>80g</b>
<b>KCl</b>	<b>4g</b>
<b>D (+) Glucose</b>	<b>10g</b>
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	<b>5.8g</b>
<b>Trypsine (Difco250)</b>	<b>5g</b>
<b>EDTA (Na salt)</b>	<b>2g</b>

Anexo II

Tabela II. Sexo e idade na altura do transplante, e dados clínicos para cada um dos 34 pacientes.									
1	M	2	50	Hodgkin	autotransplante	—	—	67/104	ausente
2	F	1	52	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	-51/98/126/130/133/137/147/157/158/159/165/173/186	BKV/ BKV e JCV
3	M	1	48	autotransplante	autotransplante	—	—	—	ausente
		2	48	Mieloma múltiplo	autotransplante	—	—	1696/1702/1708/1713/1723/1727/1730/1734/1739/1748/1773/2343	
		3	52	alotransplante	alotransplante	irmão	1	1575/1581/1587/1592/1602/1606/1609/1613/1618/1627/1652/2222 336/342/348/353/363/367/370/374/379/388/413/983	
4	M	1	37	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1270/1280/1291/1294/1298/1305/1311	BKV
		2	37	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1208/1218/1229/1232/1236/1243/1249	
		3	38					1132/1142/1153/1156/1160/1167/1173	
5	F	1	54	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1541	ausente
6	M	1	22	Leucemia mielóide crônica	autotransplante	não relacionado	1	718	BKV
		2	23	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	relacionado	1	81	
7	M	1	36	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1198	ausente
8	F	1	44	Mieloma múltiplo	autotransplante	—	—	663/673/683	ausente
		2						623/633/643	
9	M	1		Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	alotransplante	não relacionado	1	693/701/704/708/713/714	BKV
		2	6	Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	alotransplante	não relacionado	1	666/674/677/681/686/687	
		3			alotransplante	relacionado	2	637/645/648/652/657/658	
10	F	1	24	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	pais	2	36/42/49/53/56/60/67/70/74/77/81/84/88/91/95/98/109/116/130/147/190	BKV
11	M	1	40	Linfoma não Hodgkin	alotransplante	irmão	1	160	ausente
12	M	1	65	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	175/237	ausente
13	F	1	48	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	1/19/28/65	ausente/ BKV
14	M	1	35	Linfoma de Hodgkin	autotransplante	—	—	—	ausente
		2	36	Síndrome mielodisplásico/mieloproliferativo	alotransplante	não relacionado	1	326/503/510/514/517/521/534/535/549/552/556/559/563	
								-113/64/71/75/78/82/95/96/110/113/117/120/124	

Tabela II. (continuação)

15	F	2	22	Hodgkin Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	337	ausente
16	M	1	39	Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	27/31/34/41/45/48/52/55/56/59/62	BKV
17	F	1 2	55	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	134/147 15/28	BKV
18	M	1	38	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	não relacionado	1	9/13/20/21/27/30/34/37/41/48/51/55	BKV
19	M	1	2	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	pais	2	329	BKV
20	F	1 2 3	33 33 34	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	91/113/141 -28/-6/22 -178/-156/-128	ausente/BKV
21	M	1	47	Mieloma Múltiplo	alotransplante	irmão	1	-3/1/14/18/29	ausente/BKV
22	M	1	31	Leucemia linfóide crônica	alotransplante	irmão	1	126	BKV
23	M	1	42	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	133	BKV
24	M	1	31	Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	116/119	BKV
25	F	1	20	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	-58	BKV
26	M	1	59	Mieloma múltiplo	autotransplante	—	—	303	ausente
27	F	1	37	Linfoma de Hodgkin	alotransplante	irmão	1	129/133	BKV
28	M	1	18	Aplasia Medular	alotransplante	não relacionado	1	54/61/208/215	BKV
29	M	1	23	Leucemia mielóide crônica	alotransplante	irmão	1	196	BKV
30	M	1	49	Metaplasia mielóide	alotransplante	irmão	1	187	ausente
31	M	1	10	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	não relacionado	2	60/63/73	BKV
32	F	1	51	Mieloma múltiplo	alotransplante	irmão	1	32/39/46/57/60/63/64/74/77/81/84/88/91/95/98/102/105/109/141	ausente/BKV/ BKV e JCV
33	F	1	54	Leucemia mielóide aguda	alotransplante	irmão	1	21/39/46/53/56/60/82	BKV
34	M	1	30	Leucemia linfóide aguda	alotransplante	irmão	1	28	ausente

### Anexo III

#### Registo das infecções das duas experiências

##### *Primeira experiência*

23.10.05 – Em contraste com o controlo, as células infectadas possuem núcleos grandes, mas têm os “oval eyes”.

24.10.05 – A infecção desenvolveu-se muito rapidamente; foi usada demasiada concentração de vírus; a infecção atingiu todas as monocamadas; não há “ilhas” de infecção e existem algumas células a flutuar no meio.

As células dos frascos 1 e 5 não foram extraídas.

**Tabela I.** Registo da progressão da infecção na primeira experiência.

Amostras	3º dia infecção (24.10)	4º dia infecção (25.10)	5º dia infecção (26.10)	6º dia infecção (27.10)	7º dia infecção (28.10)
Controlo	OK	OK	OK	OK	OK (com grânulos)
Frasco 1	++	++/+++	+++	+++ /++++	++++
Frasco 2	++ (extração)	-----	-----	-----	-----
Frasco 3	++/+++ (extração)	-----	-----	-----	-----
Frasco 4	++/+++	+++	+++ /++++	++++	++++ (extração)
Frasco 5	++	+++ /++++	+++ /++++	++++	++++

##### *Segunda experiência*

Entre 30.11 – 04.12, as células infectadas são semelhantes às células do frasco controlo.

Desde 6 ou 7 de Dezembro o meio manteve-se cor-de-rosa.

Desde 9 de Dezembro que as células infectadas se assemelham às células do controlo, com a excepção de que as células infectadas apresentam núcleos maiores (“bigger bolls”).

Depois de 12 de Dezembro o meio ficou cor-de-laranja.

Tabela II. Registo da progressão da infecção na segunda experiência.

Amostras	5º dia infecção (05.12)	6º dia infecção (06.12)	7º dia infecção (07.12)	8º dia infecção (08.12)	9º dia infecção (09.12)	10º dia infecção (12.12)	11º dia infecção (13.12)
Controlo	OK	OK	*	1	1	1	1
Frasco 2	+						
	(extracção)						
Frasco 3	+	+/++ (extracção)					
Frasco 4	+	+/++	++ (extracção)*				
Frasco 5	+	+/++	++	++/+++ (extracção)*			
Frasco 6	+	+/++	++	++/+++	++/+++ (extracção)*		
Frasco 7	+/++	+/++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++ (extracção)*	
Frasco 8	+	+/++	++	++/+++	++/+++	++/+++	++/+++ (extracção)*

\* Algumas células a flutuar  
¹ As células pareciam estar a morrer